

エドマン分解と質量分析の組合せによるタンパク質の直接定量・定性に関する研究

著者	佐藤 涼
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16615号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00120598

エドマン分解と質量分析の組合せによる
タンパク質の直接定量・定性に関する研究

東北大学大学院薬学研究科

臨床分析化学分野

佐藤 涼

略号表

ACTH	: adrenocorticotrophic hormone (副腎皮質刺激ホルモン)
Ang	: angiotensin (アンジオテンシン)
ATZ	: anilinothiazolinone (アニリノチアゾリノン)
BSA	: bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CE	: collision energy (衝突エネルギー)
CHCA	: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸)
CID	: collision-induced dissociation (衝突誘起解離)
DPT	: <i>O,O'</i> -di-2-pyridyl thiocarbonate (<i>O,O'</i> -ジ-2-ピリジルチオカルボネート)
DTT	: dithiothreitol (ジチオスレイトール)
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ESI	: electrospray ionization (エレクトロスプレーイオン化)
FAB	: fast atom bombardment (高速原子衝撃)
HPLC	: high-performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HSA	: human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
IAA	: iodeacetamide (ヨードアセトアミド)
ICAT	: isotope-coded affinity tags
IR	: infrared spectroscopy (赤外分光法)
IS	: internal standard (内部標準)
iTRAQ	: isobaric tags for relative and absolute quantitation
LC	: liquid chromatography (液体クロマトグラフィー)

MALDI	: matrix-assisted laser desorption ionization (マトリクス支援レーザー脱離イオン化)
MS	: mass spectrometry (質量分析)
MS/MS	: tandem mass spectrometry (タンデム質量分析)
NMR	: nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
ODS	: octadecylsilyl (オクタデシルシリル)
PITC	: phenylisothiocyanate (フェニルイソチオシアネート)
PMF	: peptide mass fingerprinting (ペプチドマスフィンガープリンティング)
PTC	: phenylthiocarbamoyl (フェニルチオカルバモイル)
PTH	: phenylthiohydantoin (フェニルチオヒダントイン)
SILAC	: stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SRM	: selected reaction monitoring (選択反応モニタリング)
TFA	: trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
TOF	: time-of-flight (飛行時間型)
t_R	: retention time (保持時間)
UV	: ultraviolet (紫外)

α -アミノ酸は、以下のように略す.

Ala	: alanine (アラニン)
Arg	: arginine (アルギニン)
Asn	: asparagine (アスパラギン)
Asp	: aspartic acid (アスパラギン酸)
Cys	: cysteine (システイン)
Glu	: glutamic acid (グルタミン酸)
Gln	: glutamine (グルタミン)
Gly	: glycine (グリシン)
His	: histidine (ヒスチジン)
Ile	: isoleucine (イソロイシン)
Leu	: leucine (ロイシン)
Lys	: lysine (リジン)
Met	: methionine (メチオニン)
Phe	: phenylalanine (フェニルアラニン)
Pro	: proline (プロリン)
Ser	: serine (セリン)
Thr	: threonine (スレオニン)
Trp	: tryptophan (トリプトファン)
Tyr	: tyrosine (チロシン)
Val	: valine (バリン)

目 次

緒論	1
第1章 エドマン分解の定量性に関する検討	
第1節 序	8
第2節 PTH-アミノ酸の安定性の評価	10
第3節 $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC の調製と内部標準の $[^{13}\text{C}_6]$ -PTH-アミノ酸 の調製	15
第4節 PTH-アミノ酸の同位体希釈 LC-SRM/MS の構築	16
第5節 タンパク質からの切り出し効率の評価	25
第6節 結語	28
第2章 エドマン分解によるタンパク質定性に関する検討	
第1節 序	29
第2節 タンパク質の N 末端直接解析法の評価	30
第3節 エドマン分解試料からのタンパク質の同定	32
第4節 結語	34
結論	35
謝辞	37
実験の部	38
引用文献	53
発表論文リスト	59

緒 論

ヒトゲノム計画の完了¹⁾後のポストゲノム研究として、セントラルドグマの下流に位置し、量的・質的変動に富むタンパク質の網羅的解析，すなわちプロテオミクスがバイオマーカー探索の新戦略となった^{2,3)}。例えば，抄録・引用文献データベース Scopus (<http://www.scopus.com/>) のキーワード検索 (“genomics & biomarker” vs. “proteomics & biomarker” で後者が 2002 年以降 3 倍以上ヒットする) も，これを裏付けている (Fig. 1)。一方，創薬ターゲットの 8 割 (受容体，45%；酵素，28%；イオンチャネル，5%；核内受容体，2%) がタンパク質であること⁴⁾や，90 年代半ばのヒト化抗体作製技術の確立⁵⁾による抗体医薬等のバイオ医薬品の増加もタンパク質解析ニーズを高めている。さらに，分子標的薬である抗体医薬品は，薬価が高く，開発における成功確率も高いため，承認数を伸ばしている⁶⁾ (Fig. 2)。このように近年，基礎研究・創薬研究において研究対象がタンパク質にシフトしている。一方，タンパク質の解析では，ヒト生体内 50 万種^{7,8)}のタンパク質に加え，リン酸化⁹⁾，メチル化¹⁰⁾，糖鎖付加¹¹⁾等の酵素的翻訳後修飾体，さらには非酵素的な化学修飾体も対象とする。とりわけ，表皮ケラチンや血清アルブミン等のアバンダントプロテインの化学修飾は，ストレスマーカーとしての側面をもつ^{12,13)}。それ故，バイオ医薬品の品質管理 (日米欧医薬品規制調和国際会議，<http://www.ich.org/home.html>) の必要性も相まって，タンパク質の精密解析が要求される。

現在，タンパク質の精密解析に質量分析 (MS) が汎用されている。古くは電子イオン化¹⁴⁾，高速原子衝撃 (FAB)¹⁵⁾によるペプチド解析の例があったが，タンパク質への適用は困難であった。MS によるタンパク質解析のブレークスルーとなったのは，2002 年のノーベル化学賞の対象となった高分子のイオン化技術，すなわちエレクトロスプレーイオン化 (ESI)¹⁶⁾とマトリクス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)¹⁷⁾である。両者は，タンパク質をインタクトのままイオン化

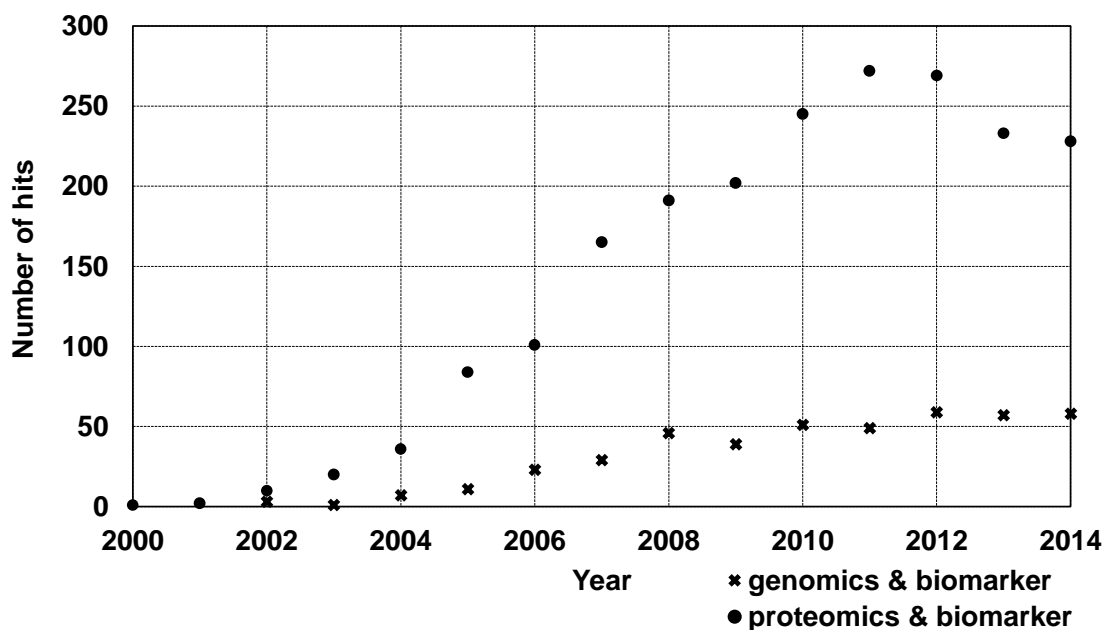


Fig. 1 The number of hits using the keyword search in Scopus (<http://www.scopus.com/>). Keywords: “genomics & biomarker” vs. “proteomics & biomarker.”

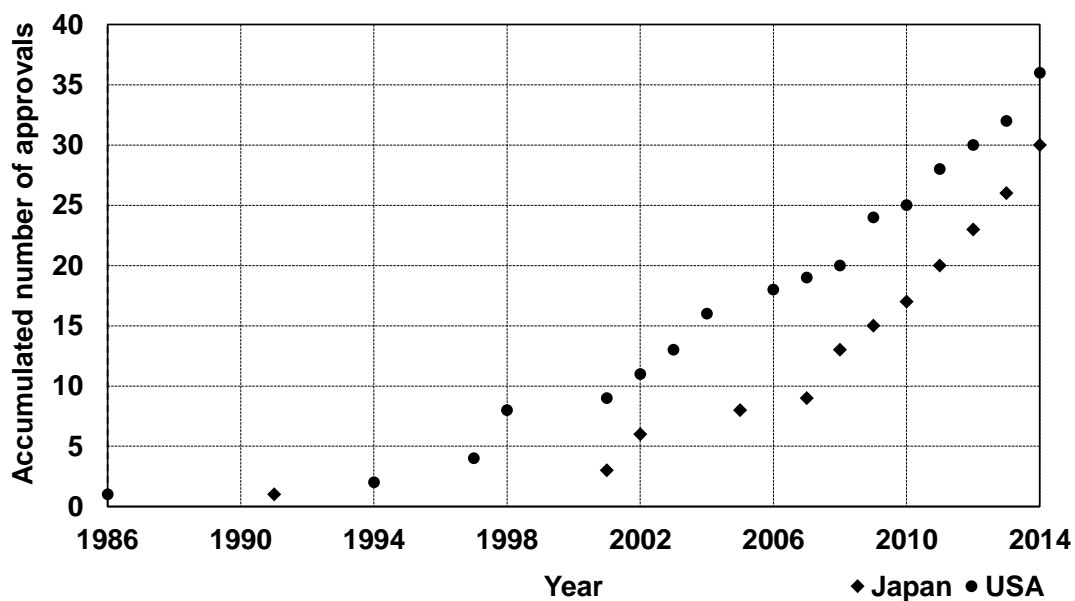


Fig. 2 Change in the accumulated number of approvals of biopharmaceuticals in Japan and USA.

するものである。前者は、3–4 kV の高電圧を印加したニードルから試料を帯電液滴としてスプレー・イオン化する方法であり、液体クロマトグラフィー (LC) と MS の直結の他、多価イオン生成による機器の測定範囲を超えた分子量測定

も可能とした。また後者は、大過剰量の有機マトリクス中の試料分子をパルスレーザーで爆発気化させる方法であり、飛行時間型 (TOF)/MS との組合せで数十万 Da の生体高分子でも直接測定できる。さらにイオントラップ型質量分析計等の質量分離部の技術革新が、網羅的なタンデム質量分析 (MS/MS) に必要なデータディペンデントスキャンを可能にした¹⁸⁾。加えて、酵素消化のパターン解析であるペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法¹⁹⁾、部分アミノ酸配列情報を用いるペプチドシーケンス法 (MS/MS 法)²⁰⁾ のための、タンパク質データベース (Swiss-Prot, NCBItr 等)、検索アルゴリズム (Mascot[®] 21), SEQUEST[®] 22)) も充実し、タンパク質の同定法 (定性分析法) は、ほぼ確立された。ちなみにペプチドのフラグメントイオンは、ビーマン法²³⁾ (Fig. 3a) により、N 末端側の a, b, c イオン、C 末端側の x, y, z イオンで表され、特徴的な b, y イオンの質量差を利用してアミノ酸配列を解析する²⁴⁾ (Fig. 3b)。

一方、網羅的なタンパク質の定量分析法として、安定同位元素による標識が汎用されている。例えば、細胞培養により標識を行う stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)²⁵⁾、heavy/light 同位体によるチオール標識とアビジンカラム精製を組合せた isotope-coded affinity tags (ICAT)²⁶⁾、アミン標識と同位体ラベルの組合せで複数の実験系を同時測定する isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)²⁷⁾ である。これらは、いずれも発現量の増減のみを見る相対定量であり、細胞実験系に限定 (SILAC)、Cys 含有ペプチドに限定 (ICAT)²⁸⁾、高コストに加え三連四重極型 MS/MS と専用ソフトの準備 (iTRAQ) 等、各々課題を残している。一般に秤量可能な標品を必要とする絶対定量は、網羅的プロテオミクスでは不可能であり、アミロイドβ等の標品の得られる対象²⁹⁾ や、合成サロゲートペプチドを標品とする膜タンパクトランスポーター³⁰⁾ の定量等、測定対象を限定した標的プロテオミクスとして行われる。

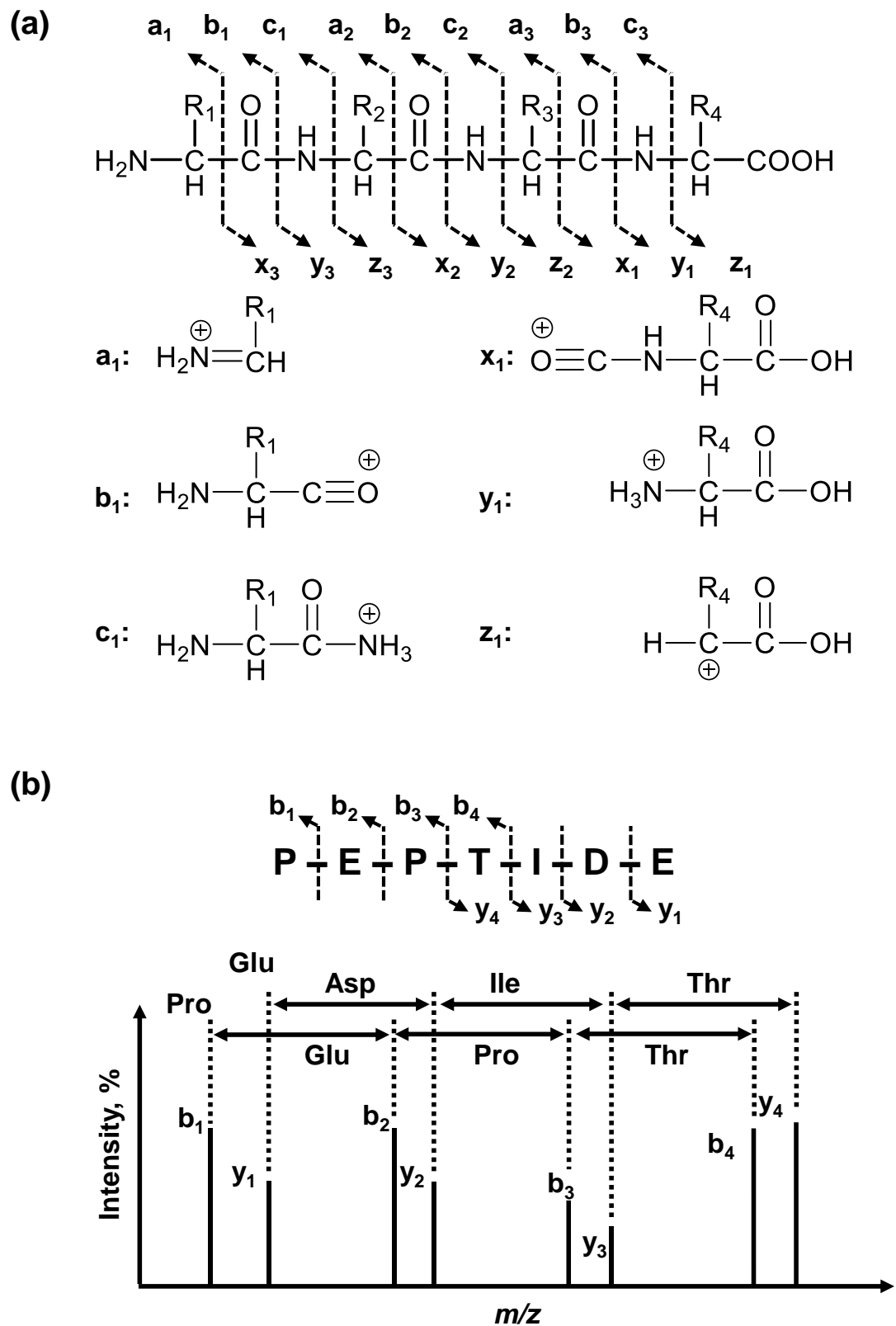


Fig. 3 (a) Nomenclature of peptide fragment ions and (b) peptide sequencing.

MS 以前の古典的タンパク質分析法には、現在も臨床・生化学研究で汎用されるものが多い。例えば、比色定量法のローリー法³¹⁾やブラッドフォード法³²⁾は、夾雑物 (核酸) やタンパク質の種類の影響を受ける一方、その簡便さから総量分析法・非特異的分析法として汎用される。また、特異的分析法である免疫アッセイ³³⁾も、検体処理能力・感度に優れるため汎用されるが、抗体作製に時間を要すること、交差反応性・多成分同時分析に問題がある。

一方、古典的定性法のエドマン分解 (Fig. 4)³⁴⁾は、アミノ酸配列決定法として現在でも幅広く用いられている。本法はフェニルイソチオシアネート (PITC, Fig. 4a) を試薬として用い、ペプチドの N 末端アミノ酸をフェニルチオヒダントイン (PTH) 誘導体として順次切り出し、定性するものである。その反応³⁵⁾は、以下に示す 3 段階からなる。

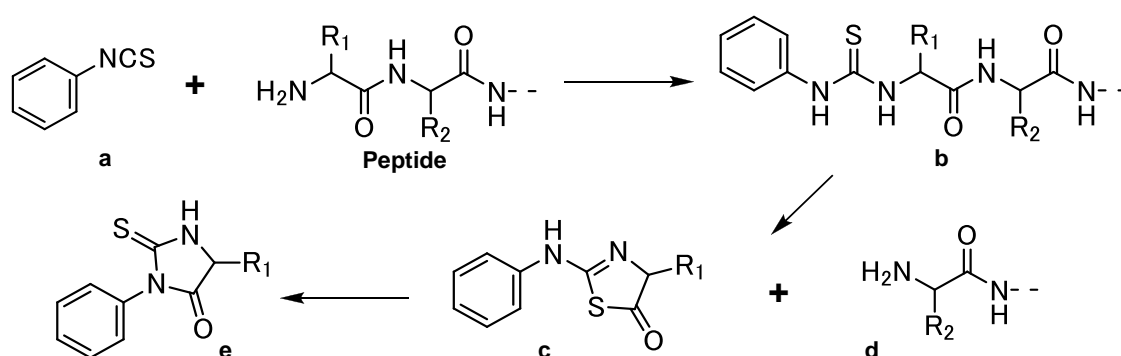


Fig. 4 Edman degradation. (a) Edman's reagent (PITC), (b) PTC-peptide, (c) ATZ-amino acid, (d) des-1-peptide, (e) PTH-amino acid.

- (1) 付加反応：ペプチド N 末端のフェニルチオカルバモイル (PTC) 化 (Fig. 4b, 塩基性条件),
- (2) 切断反応：N 末端アミノ酸のアニリノチアゾリノン (ATZ) 化 (Fig. 4c, 強酸性条件),
- (3) 転換反応：ATZ 誘導体の、より安定な PTH-アミノ酸への異性化 (Fig. 4e, 酸性水溶液条件).

この後、des-1-ペプチド (Fig. 4d) は、再度反応に付し、N 末端から順次配列を決定する。通常、本反応は、20–60 サイクル^{36,37)}が限度であり、タンパク質への

適用は、トリプシン等による酵素消化との組合せで行われる。本法には、自動化³⁸⁾や小型化³⁹⁾等、様々な改良が重ねられており、高感度化を指向した蛍光エドマン型試薬⁴⁰⁾、標識時のみ蛍光性を発する 4-(*N,N*-ジメチルアミノスルホニル)-7-イソチオシアナト-2,1,3-ベンゾキサジアゾール⁴¹⁾、さらに光学分割能を持たせた 4-(3-イソチオシアナトピロリジン-1-イル)-7-(*N,N*-ジメチルアミノスルホニル)-2,1,3-ベンゾキサジアゾール⁴²⁾も開発されている。ちなみに、N 末端修飾ペプチドへの対応として、C 末端側からの配列決定法もシアノブロマイド⁴³⁾、カルボキシペプチダーゼ⁴⁴⁾、エドマン型試薬 (ジフェニルホスホリルイソチオシアネート⁴⁵⁾やトリフェニルゲルマニルイソチオシアネート⁴⁶⁾) を用いて報告されている。

そこで本研究では『温故知新』との考えで、古典的なエドマン分解と最新技術である MS 相互の利点・欠点 (Table 1) を補完したタンパク質直接解析法の開発を目的とした。すなわち、MS の利点 (m/z ・フラグメンテーションによる精密定性) により、エドマン分解の欠点 (分解反応と LC 保持時間 (t_R) のみの定性) を補い、エドマン分解の利点 (PTH 標品の入手容易さと量論的な反応) により、MS の欠点 (タンパク質標品の入手困難さとイオン化に起因する非量論的レスポンス) を補うものである。まず第 1 章では、エドマン分解の定量性を MS により精査した。具体的には、PTH-アミノ酸の同位体希釈 LC-選択反応モニタリング (SRM)/MS による定量を目指し、(i) 検討例のない PTH-アミノ酸標準液の安定性

Table 1 Summary of advantage and disadvantage for Edman degradation and mass spectrometry.

Method	Advantage	Disadvantage
Edman degradation	Availability in all PTH standards	Degradation of PTH analytes
	Quantitative reaction	Less qualitative due to LC separation only
Mass spectrometry	Accuracy in qualitative analysis by using mass measurement	Deficiency in quantitative response from the equipment
	Selectivity attributed to fragmentation	Lack of available standards for protein quantitation

の評価, (ii) [$^{13}\text{C}_6$]-PITC の調製と標識 PTH-アミノ酸の一斉調製, (iii) 同位体希釈 LC/ESI-MS/MS 条件の最適化, (iv) タンパク質 N 末端からの PTH-アミノ酸切り出し効率を検討した. 次いで第 2 章では, エドマン分解の定性能を MS により精査した. すなわち, インタクトのタンパク質の直接定性を目指し, (i) N 末端アミノ酸の直接解析, (ii) エドマン分解後の des-1-タンパク質からの直接同定の可能性を評価した.

第 1 章 エドマン分解の定量性に関する検討

第 1 節 序

定量分析におけるエドマン試薬と MS の組合せでは、イオン化効率向上を企図した極性官能基の導入と安定同位元素標識した試薬デザインが汎用される。例えば、 $[^2\text{H}_6]$ -4,6-ジメトキシピリミジン-2-イソチオシアネート⁴⁷⁾、 $[^{13}\text{C}_6]$ -スルホフェニルイソチオシアネート⁴⁸⁾は、各々イオントラップ TOF-MS と、MALDI/TOF/TOF-MS および LC-MS/MS において、対応する非標識体をコントロールと実験系で使い分け、ペプチドの増減を見る相対定量に用いられる。しかしながら、これらはいずれもペプチドの標識を目的とするため、付加反応のみで得られる PTC-ペプチド誘導体が分析対象となる。一方、分解反応を含めたエドマン試薬の定量分析への利用は、全工程の反応収率、PTH-アミノ酸の安定性の問題もあり、紫外 (UV) 検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (HPLC-UV) で濃度依存的な直線性の確認⁴⁹⁾、PTH-アミノ酸の安定化の試み⁵⁰⁾があるものの、未だ不十分であった。ちなみに Brune らは、定量性の観点で 3 種ペプチド、B (KAQYARSVLLEKDAEPDILELATGYR)、C (RQAKVLLYSGR)、C* (RQAK (acetyl) VLLYSGR) からの N 末端アミノ酸の切り出しや PTH アミノ酸の回収率を精査した⁵¹⁾。その結果、B および C+C*からのサイクル間の相対収率は 90–98%であるものの、1 サイクル目の絶対回収率は各々 65.6%、67.0%であった。すなわち、この 30%以上のロスの原因は、付加・切断反応ではなく、PTH-アミノ酸の安定性・溶解性等に起因することを意味し、長鎖ペプチドからでも N 末端の切り出しが定量的と示唆された。

そこで本章では、絶対回収率低下の影響を排除し、タンパク質を直接エドマン分解することで、PTH-アミノ酸としてのタンパク質絶対定量が可能か否かを探ることを目的とした。すなわち、PTH-アミノ酸の絶対回収率の改善およびロスの補正を目的に、従来検討例がない PTH-アミノ酸標準液の安定性の評価、内

部標準 (IS) 用の安定同位元素標識エドマン試薬の調製とアミノ酸混液への反応, 感度・選択性に優れる SRM の構築をし, インタクトのタンパク質から PTH-アミノ酸を得る全工程の収量精査を行った.

第2節 PTH-アミノ酸の安定性の評価

20 種 PTH-アミノ酸の標品は、いずれも入手可能かつ混合品としても市販されている。しかし、定量法の再現性を担保するには、標準液の保存安定性の評価が必要である。そこで本節では、PTH-アミノ酸の長期保存安定性を、酸性、中性、塩基性条件 (4 °C) で検討した。すなわち、HPLC-UV により経時的に PTH-アミノ酸を分析し、残存率をプロットした。ちなみに緩衝液には、10 mM ギ酸アンモニウム (pH 3), 5 mM リン酸ナトリウム (pH 7), 5 mM トリエチルアミン塩酸 (pH 11) を用い、疎水性 PTH-アミノ酸の溶解性も考慮し、緩衝液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液中、保存した。さらに、PTH-アミノ酸の標品を安定なアミノ酸から用時調製することも念頭に、エドマン分解の転換反応液である 25% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液も検討した。その他、IS として、試料調製時に 1-ナフタレン酢酸、安息香酸、フェノールのいずれかを一定量添加した。

まず、20 種 PTH-アミノ酸の典型例として、酸性の Asp および塩基性の Arg のグラフを示した (Fig. 5)。その結果、PTH-Asp では、25% (v/v) TFA 水溶液中の

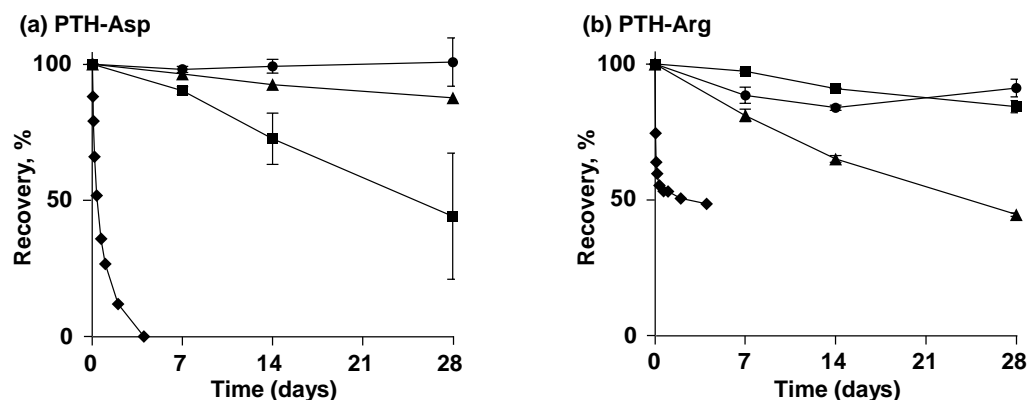


Fig. 5 Typical stability of (a) PTH-Asp (acidic) and (b) PTH-Arg (basic). Conditions: (circles, n=3) 25% (v/v) aqueous TFA, (squares, n=3) 10 mM ammonium formate buffer (pH 3)-acetonitrile (3:1, v/v), (triangles, n=3) 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7)-acetonitrile (3:1, v/v), (diamonds, n=1) 5 mM triethylamine-hydrochloride buffer (pH 11)-acetonitrile (3:1, v/v).

残存率 (n=3) が, 28 日後でも 100.8%であった. 一方, pH 3 および 7 中では, 28 日後で各々 44.2%, 87.6%であった. これに対し, pH 11 中での残存率は, 96 時間後に 0.1%であり, 大幅に分解していた. 一方, PTH-Arg では, 25% (v/v) TFA, pH 3 および 7 中 28 日後に各々 91.1%, 84.3%, 44.4%, pH 11 中 96 時間後に 48.4%であった. PTH-Arg は, PTH-Asp と同様, TFA 中で最も安定であり, 塩基性条件下の保存には適さないことが判明した.

そのほかの PTH-アミノ酸についても, 同じく検討した (Fig. 6). まず, 上記で最も安定であった 25% (v/v) TFA 中 (Fig. 6, circles) の 28 日後の残存率は PTH-Ser, Gln で 21.9%, 26.7%と, 保存状態として適さないことが判明した. Ser, Glu 残基は, それぞれ酸性下の分解が予想される水酸基とアミド結合を有するが, 類似の構造をもつ Thr, Asn では, 各々 87.1%, 78.6%と比較的安定であったことから, 脱水, 加水分解のみならず, 側鎖と PTH 環の相互作用等も安定化に寄与すると考えた. 同様に pH 3 条件 (Fig. 6, squares) では, Asp と同様, 酸性官能基を有する PTH-Glu (60.9%) の安定性に難があったが, Pro の 99.9% (28 日後) を始め, アルキル側鎖を有するものは比較的安定であった. pH 7 中 (Fig. 6, triangles) では, 28 日後に PTH-Cys, Gln, Leu, Ser がほぼ消失するのに対し, Ile の 96.1%等安定なものも存在し, 側鎖官能基の極性のみでは説明できなかった. pH 11 中 (Fig. 6, diamonds) では, おおむねどのアミノ酸も急激な分解がみられたが, PTH-Ile, Tyr, Trp は 3 日間で少なくとも 80%程度残存していた. ちなみに, PTH 環の塩基性条件下の加水分解⁵²⁾が報告されており, 今回の結果と合致していた. また, 一部ピーク面積から計算された残存率が 100%以上を示したものは, 操作中の IS の揮散等に起因すると考えた.

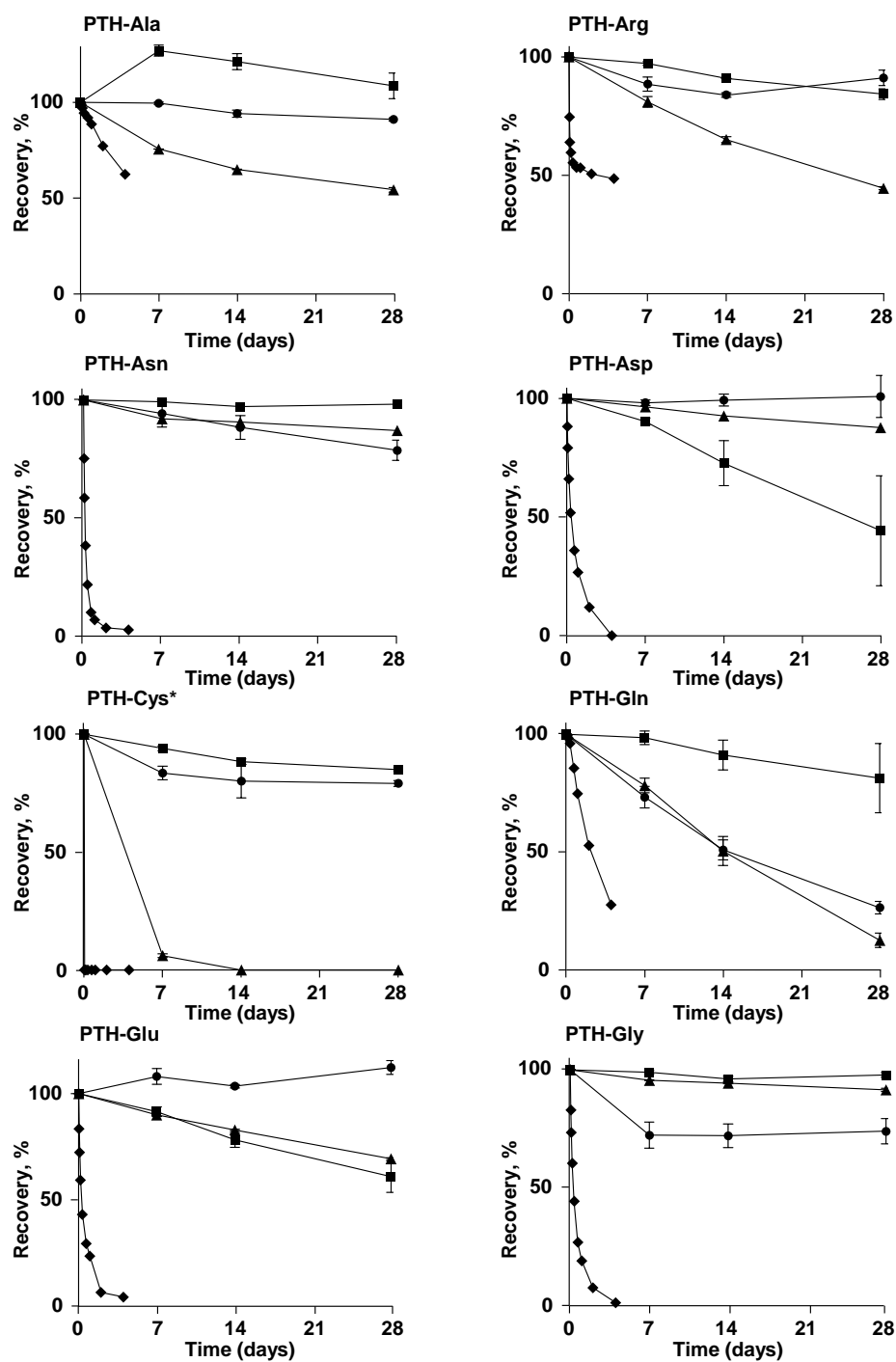


Fig. 6 Stability of all 20 PTH-amino acids. Conditions: (circles, n=3) 25% (v/v) aqueous TFA, (squares, n=3) 10 mM ammonium formate buffer (pH 3)–acetonitrile (3:1, v/v), (triangles, n=3) 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7)–acetonitrile (3:1, v/v), (diamonds, n=1) 5 mM triethylamine-hydrochloride buffer (pH 11)–acetonitrile (3:1, v/v).

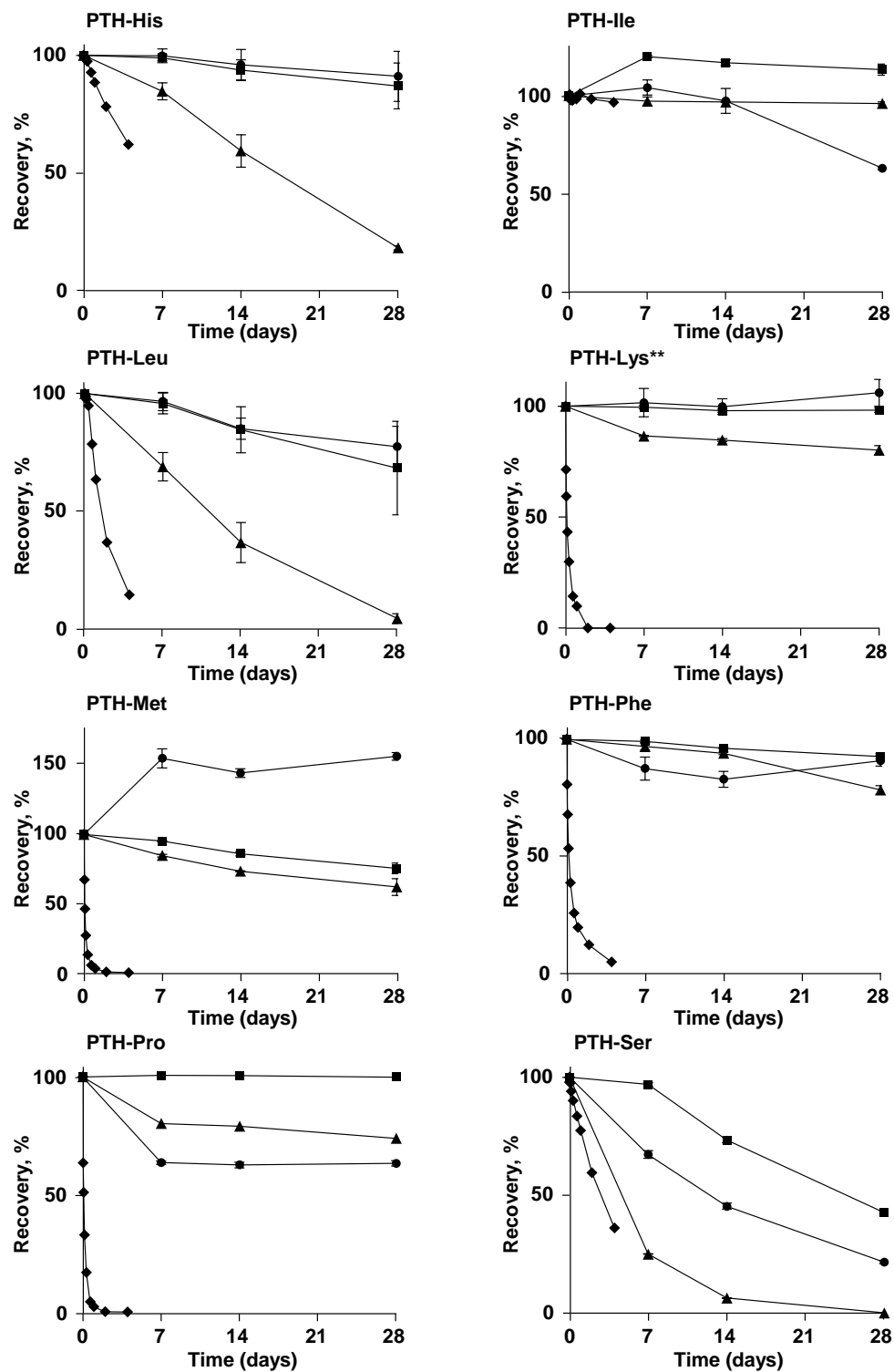


Fig. 6 (continued)

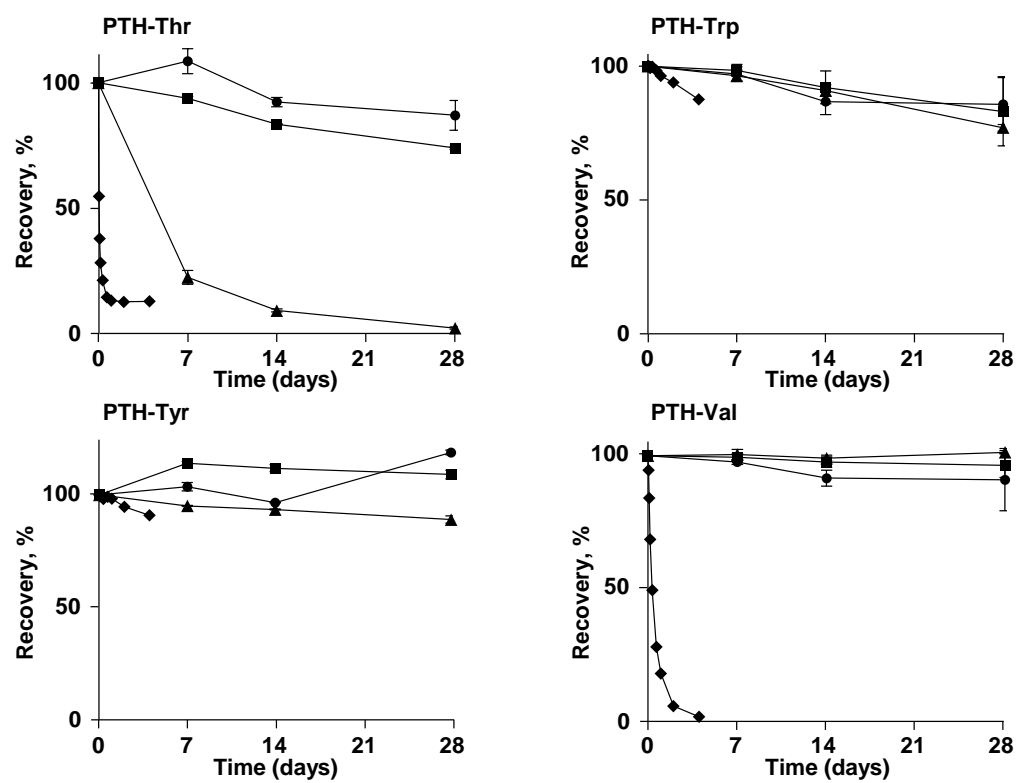


Fig. 6 (continued)

第3節 $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC の調製と内部標準の $[^{13}\text{C}_6]$ -PTH-アミノ酸の調製

反応性官能基のイソチオシアネートは、通常、対応するアミンから調製する。そこで、市販の安定同位元素標識アニリン ($^{13}\text{C}_6$, $^2\text{H}_6$, $^{15}\text{N}_1$) のうち、質量差が大きく同位体効果の少ない $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリンを選択し、 $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC を調製した。アミンからイソチオシアネートの調製には、アニリンを二硫化炭素と反応後、塩化ホスホリル⁵³⁾、またはクロロギ酸エチル⁵⁴⁾が従来用いられていたが、試薬の毒性、反応収率、反応スキームの煩雑さから、*O,O'*-ジ-2-ピリジルチオカルボネート (DPT)⁵⁵⁾を用いる one-pot 反応⁵⁶⁾で調製した (Fig. 7)。すなわち、クロロホルムを溶媒として $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリンに 2 モル当量の DPT を常温で混和し、カラムクロマトグラフィーで精製するのみで、目的物を得た。遊離の α -アミノ酸から PTH-

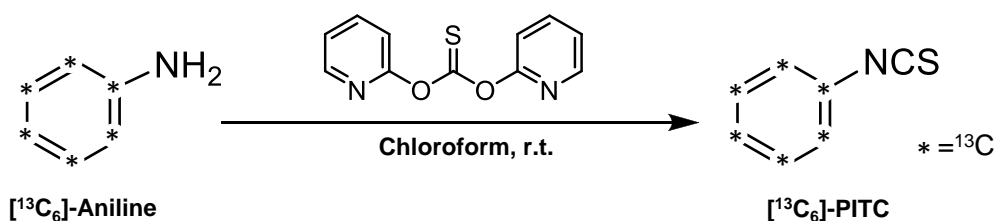


Fig. 7 Structure and synthesis of $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC.

アミノ酸を得るには、付加反応を経た環化反応と安定化体への再環化反応で済むため、エドマン分解における切断反応を必要としない⁵⁷⁾。それ故、以降 IS として用いる $[^{13}\text{C}_6]$ -PTH-アミノ酸は、 α -アミノ酸から一気に調製した。

第 4 節 PTH-アミノ酸の同位体希釈 LC-SRM/MS の構築

感度・選択性に優れた多成分の分析には、クロマトグラフィーによる相互分離と特異的検出法が必要である。とりわけ PTH-アミノ酸のような極性化合物の場合、逆相系 HPLC と ESI-MS の組合せが最適である。また、質量分離に三連四重極型 MS/MS を用いる時、特徴的なフラグメンテーションを利用した SRM が可能である。これは、特定のプリカーサーイオンをアルゴンやヘリウム等の不活性ガスで衝突誘起解離 (CID) し、特定のプロダクトイオンを検出する方法であり、同一質量のプリカーサーイオンおよびプロダクトイオンを生じない限り、選択的な検出が可能である。一方、MS は感度・選択性に優れるものの、夾雑物によるイオン化抑制やイオン源の状態で大きくレスポンスが異なる。そこで本節では、ESI に適した LC 条件と選択的な SRM 条件を最適化し、前節で調製した [$^{13}\text{C}_6$]-PTH-アミノ酸を IS に用いた同位体希釈分析法の構築を企てた。

まず LC 条件を精査した。 t_R のみで分別する LC-UV では、副生成物を含めた PTH-アミノ酸相互の分離が必須であり、カラムにはオクタデシルシリル (ODS) 固定相、移動相には pH を厳密に調製した酢酸ナトリウム、あるいはギ酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルとの混液の組合せが汎用される^{58,59)}。一方、LC-MS では質量分離が可能なことから、20 種すべての分離は必須条件ではなく、イオン化効率と同一質量の PTH-Leu と PTH-Ile の分別のみ考慮すれば良い (Fig. 8)。

ちなみに、Leu と Ile は、高エネルギーCIDを用いた MS/MS によるアルキル鎖の開裂で分別できる⁶⁰⁾が、

LC-MS で汎用される三連四重極型では使用できず、本測定系への適用は難しい。そこで、これらの分離を、

ポジティブイオンモードでの ESI を考慮した酸性条件で検討した。その結果、一般的な逆相系 ODS カラム、および水系溶媒に 0.1% (v/v) ギ酸水溶液、有機系

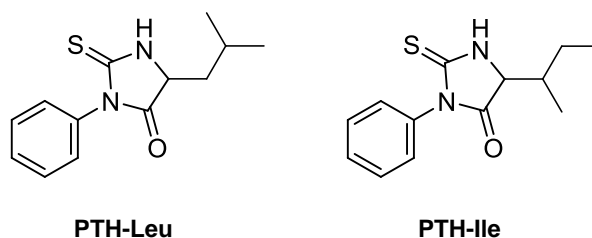


Fig. 8 Isobaric isomers: PTH-Leu and PTH-Ile.

溶媒にアセトニトリルを用いた時, PTH-Leu と PTH-Ile の分離を達成した (Fig. 9). この時, PTH-Leu (Fig. 9a) および PTH-Ile (Fig. 9b) の t_R は, 各々 34.0, 32.9 分 (分離係数 1.04) であった. さらに, 両者の分離度は 2.45 であり (Fig. 8c), ベースライン分離を達成した. ここで, 整数質量の同じ Gln (m/z 128.129) と Lys (m/z 128.172) は, 後者が側鎖 ϵ -アミノ基の PITC 付加体 (N^ϵ -PTC-Lys) へ誘導されることから, 容易に分別できる. なお PTH-Cys は, 側鎖スルフヒドリル基を保護

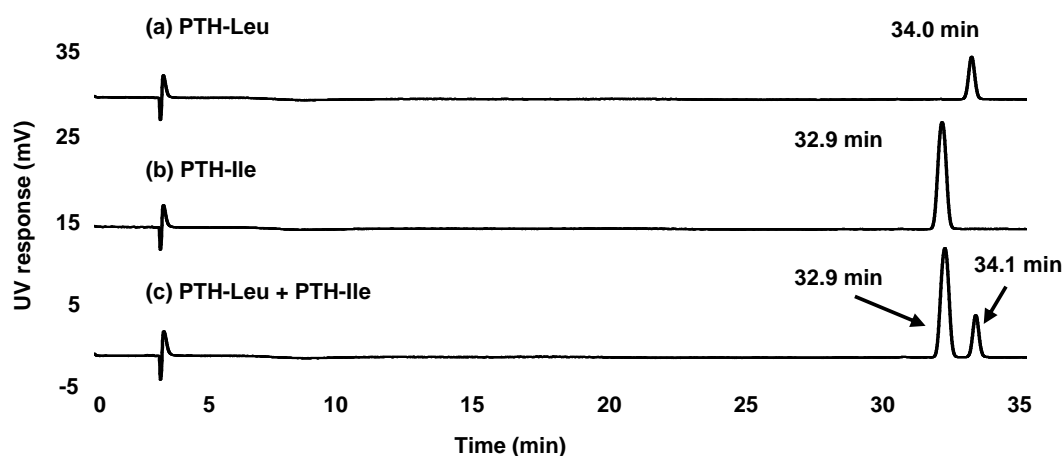


Fig. 9 HPLC-UV (wavelength, 269 nm) separation of PTH-Leu and PTH-Ile. **(a)** PTH-Leu, **(b)** PTH-Ile, **(c)** PTH-Leu and PTH-Ile (each 100 pmol).

した *S*-カルボキシメチル化体である.

次いで, 20 種 PTH-アミノ酸標品を用い, 衝突エネルギー (CE) 30 eV の時のプロダクトイオンを精査した. 実験では, 標準物質の 50% (v/v) アセトニトリル水溶液を質量分析計付属のシリンジポンプから 10 μ L/min で送液し, LC の移動相 (ギ酸/水/アセトニトリル=0.1:68:22, v/v/v, 0.2 mL/min) と合わせ, MS に付した. 得られたプロダクトイオンスペクトルの典型例として, PTH-Asp および PTH-Arg について示した (Fig. 10). 酸性の PTH-Asp (Fig. 10a) からは, PTH 環に由来する m/z 136, 77 のフラグメントを見出した. 一方, 塩基性側鎖を有する PTH-Arg (Fig. 10b) からは, 側鎖に由来する m/z 233, 70 のものが示唆された. 故に, PTH-Arg の場合, プロトン化は塩基性側鎖のグアニジド基で起こると考えた. そのほかの PTH-アミノ酸, 個々のプロダクトイオンスペクトル (Fig. 11) で

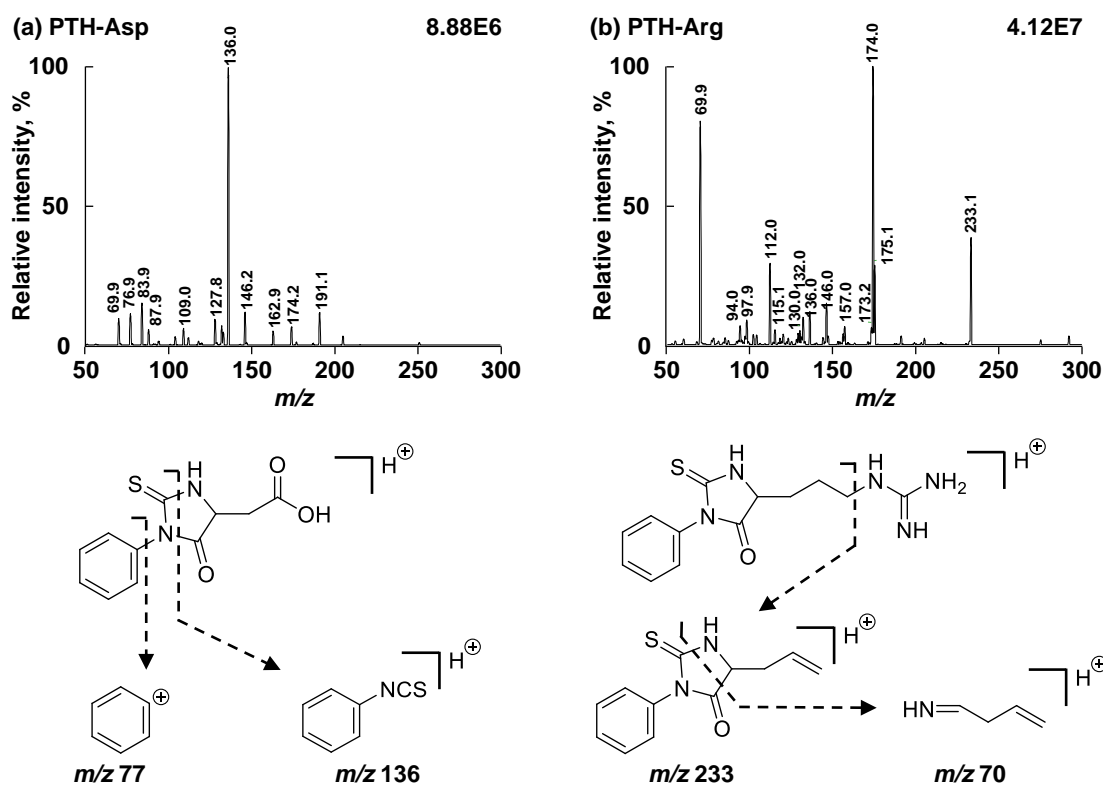


Fig. 10 Typical examples of fragmentation patterns of PTH-amino acid: (a) PTH-Asp (acidic) and (b) PTH-Arg (basic). The CE was 30 eV.

は、典型的なフラグメントとして、 m/z 193, 136, 77 のものを確認し、各々、側鎖部分、PTH-Asp と同様の PITC、フェニル基部位の開裂と推測できた。また、特徴的な開裂として、PTH-Glu では側鎖部位の環化体 (m/z 84), PTH-Met では側鎖から -48 Da シフトしたもの (m/z 219), PTH-Cys では側鎖カルボキシ基からの脱炭酸体 (m/z 251), PTH-Lys では、側鎖から -93 Da シフトした PTC 部位の脱離体 (m/z 306) が得られた。これまでに得た知見の下、別途最適化したプロダクトイオンと CE をまとめた (Table 2)。イオンの選択には、アミノ酸側鎖の開裂で特徴的なものがあれば、それを優先したが、強度が著しく低い場合は、典型的な m/z 193, 136, 77 のなかから最大強度のものを適宜採用した。また、IS として用いる 20 種 ^{13}C 標識体については、各々非標識体に対応させ選択した。20 種 α -アミノ酸混合標準液を PITC、あるいは先に調製した $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC と 2 段階で反応させ、最適化した LC-SRM/MS 条件で測定した結果を示した (Fig. 12)。

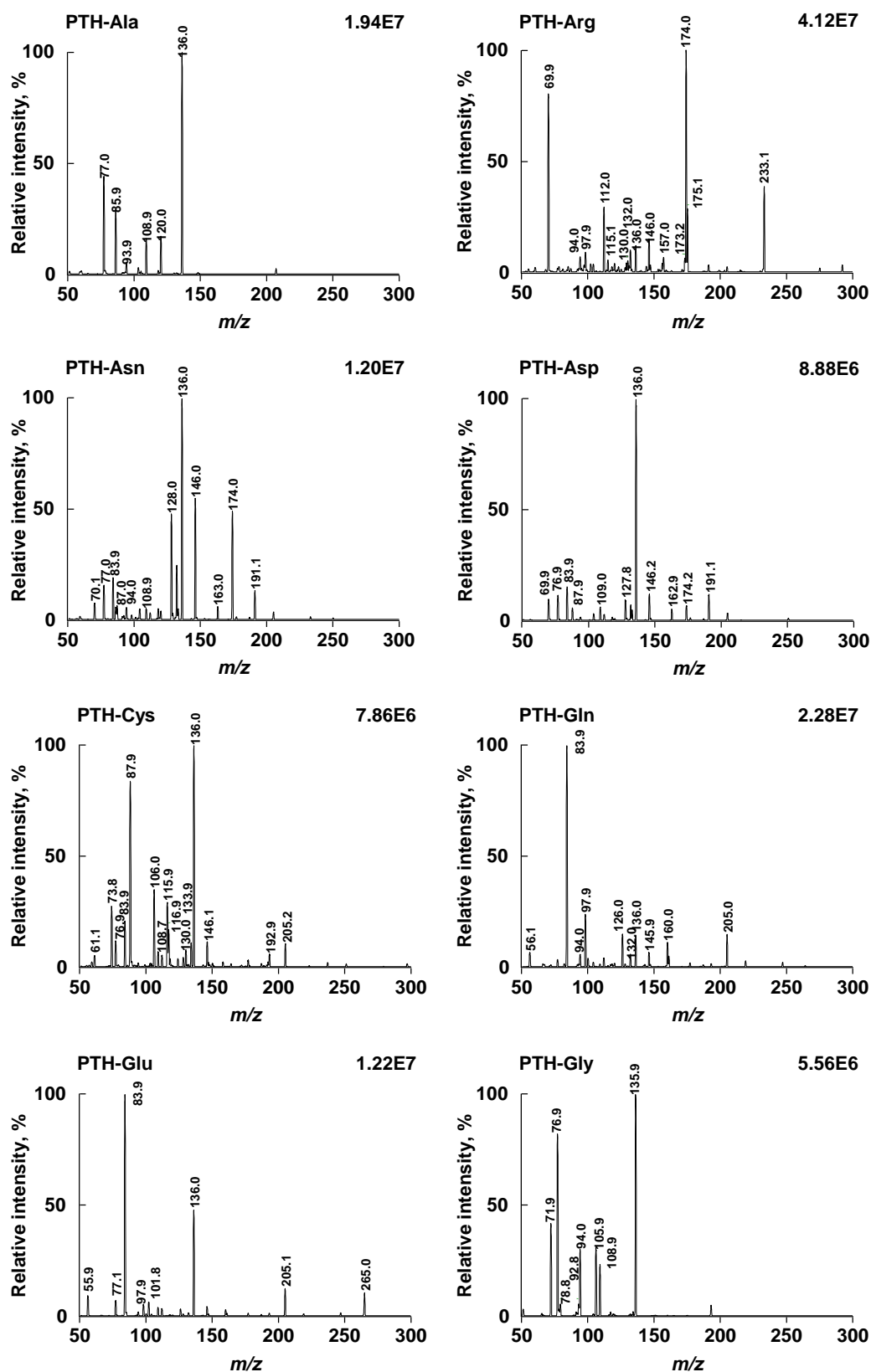


Fig. 11 MS/MS spectra of PTH-amino acids. The CE was 30 eV.

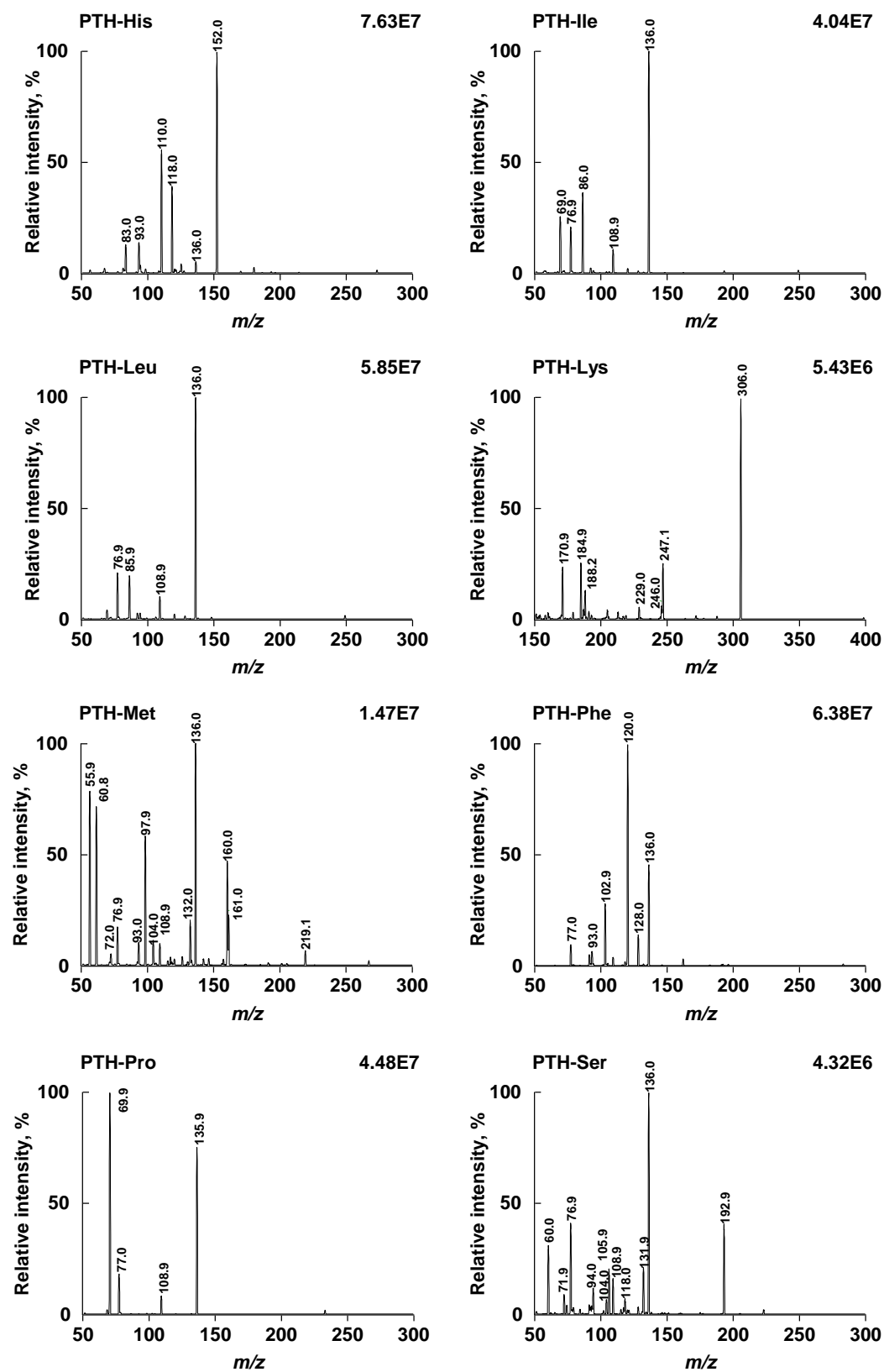


Fig. 11 (continued)

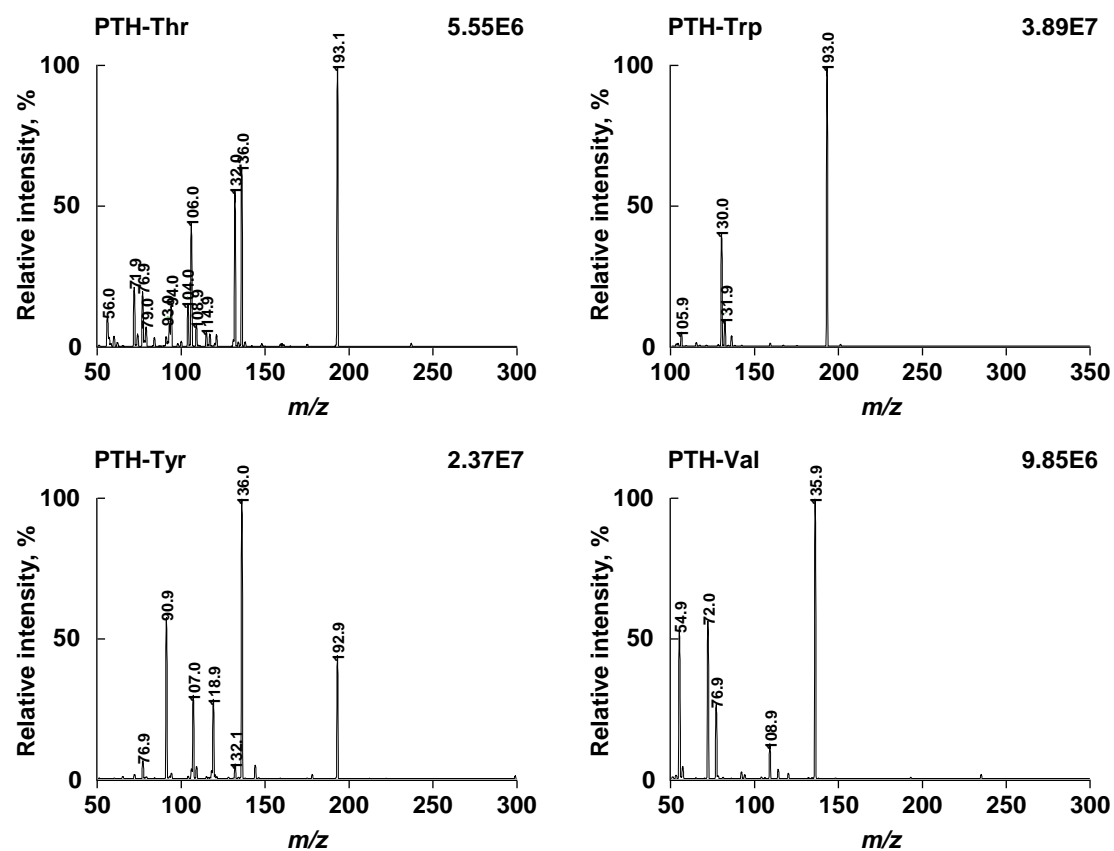


Fig. 11 (continued)

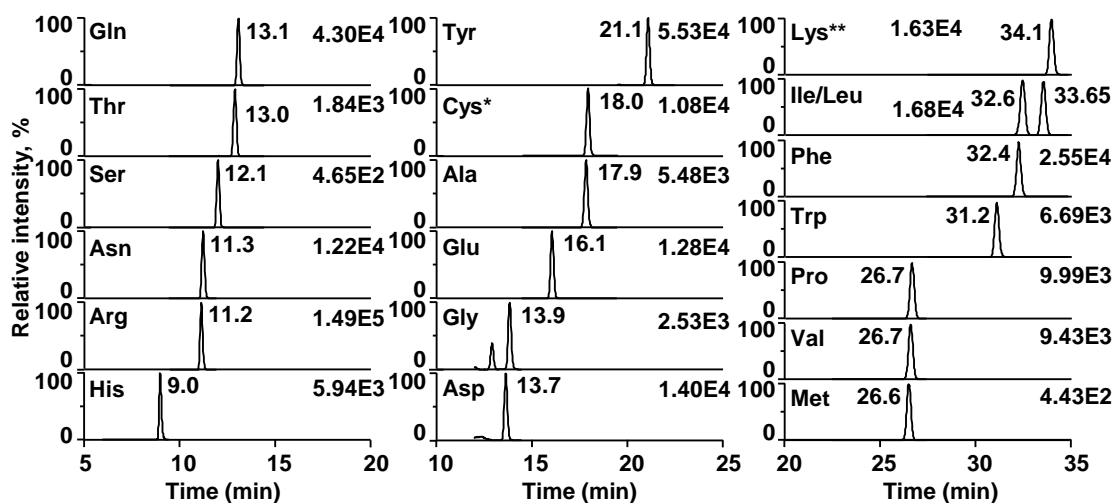
Table 2 Optimized SRM of unlabeled and [¹³C₆]-PTH-amino acids. Parameters of precursor ion, product ion and collision energy were showed about each PTH-amino acid.

Amino acid	Unlabeled PTH-amino acid		[¹³ C ₆]-PTH-amino acid		Collision energy, eV
	Precursor ion, <i>m/z</i>	Product ion, <i>m/z</i>	Precursor ion, <i>m/z</i>	Product ion, <i>m/z</i>	
Ala	207	136	213	142	21
Arg	292	233	298	239	17
Asn	250	136	256	142	24
Asp	251	136	257	142	24
Cys ^a	297	251	303	257	12
Gln	264	247	270	253	11
Glu	265	205	271	211	17
Gly	193	136	199	142	18
His	273	152	279	152	17
Ile	249	136	255	142	24
Leu	249	136	255	142	24
Lys ^b	399	306	411	312	13
Met	267	219	273	225	13
Phe	283	136	289	142	28
Pro	233	136	239	142	22
Ser	223	193	229	199	13
Thr	237	193	243	199	13
Trp	322	193	328	199	14
Tyr	299	136	305	142	15
Val	235	136	241	142	24

a. *S*-carboxymethyl

b. *N*^ε-phenylthiocarbamoyl

(a) Unlabeled PTH-amino acids



(b) [$^{13}\text{C}_6$]-PTH-amino acids

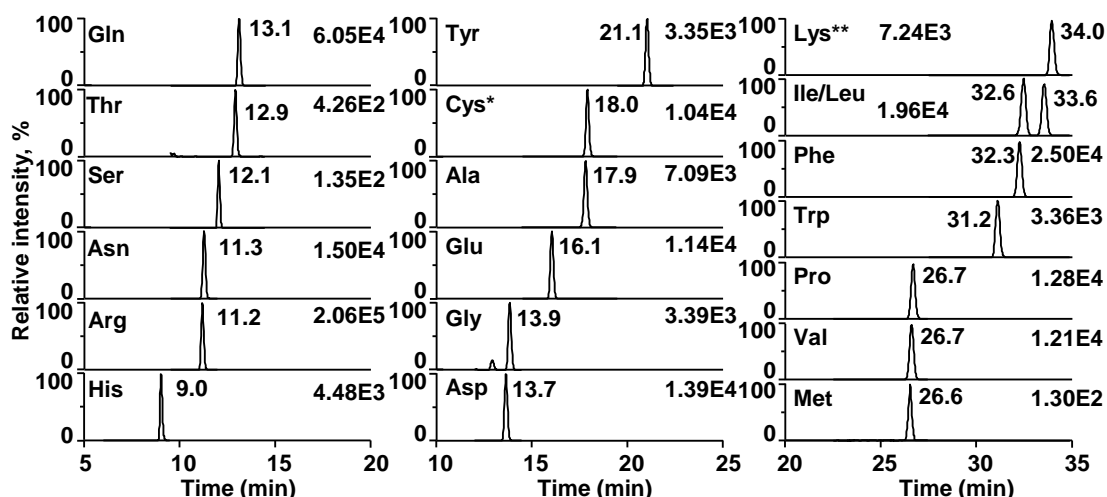


Fig. 12 SRM chromatogram of PTH-amino acids. (a) Unlabeled PTH-amino acids and (b) [$^{13}\text{C}_6$]-PTH-amino acids. PTH-amino acids are abbreviated to three-letter names except Cys* [PTH-S-(carboxymethyl)-Cys] and Lys** [PTH-(N^{ϵ} -PTC)-Lys].

次いで、用時調製で同時に得た PTH-アミノ酸および ^{13}C 標識 PTH-アミノ酸を用い 20 種検量線を作成した (Table 3). ちなみに、希釈系列の濃度は 0.1–10 μM 間の 7 点とし、各 10 μL (1–100 pmol) を構築した同位体希釈 LC-SRM/MS に付した。その結果、決定係数 (r^2 値) が少なくとも 0.989 以上となった。

Table 3 Calibration curves of PTH-amino acids over [$^{13}\text{C}_6$]-PTH-amino acids.

Amino acid	Equation	r^2
Ala	$y = 0.0167 + 0.0537x$	0.999
Arg	$y = -0.0228 + 0.0568x$	1.000
Asn	$y = 0.0291 + 0.0459x$	0.989
Asp	$y = -0.0545 + 0.0532x$	0.996
Cys ^a	$y = -0.0552 + 0.0739x$	0.999
Gln	$y = 0.3859 + 0.0533x$	0.995
Glu	$y = -0.0432 + 0.0632x$	0.999
Gly	$y = 0.0745 + 0.0544x$	1.000
His	$y = -0.0165 + 0.0556x$	1.000
Ile	$y = -0.0523 + 0.0510x$	0.998
Leu	$y = -0.0369 + 0.0577x$	0.999
Lys ^b	$y = -0.0749 + 0.0499x$	0.998
Met	$y = -0.0320 + 0.0579x$	1.000
Phe	$y = -0.0246 + 0.0522x$	1.000
Pro	$y = -0.0343 + 0.0563x$	0.999
Ser	$y = 0.1484 + 0.0591x$	1.000
Thr	$y = -0.0141 + 0.0535x$	0.999
Trp	$y = -0.0264 + 0.0430x$	0.999
Tyr	$y = -0.1234 + 0.7407x$	0.999
Val	$y = -0.0204 + 0.0489x$	1.000

a. *S*-carboxymethyl

b. *N*^ε-phenylthiocarbamoyl

第5節 タンパク質からの切り出し効率の評価

エドマン分解は、通常ペプチドの配列解析に用いられており、インタクトのタンパク質との反応性や収率を検討した例はない。一方、エドマン分解によりインタクトのタンパク質から定量的に N 末端の切り出しが可能であれば、未知タンパク質を標品なしに PTH-アミノ酸として絶対定量できる可能性が出てくる (Fig. 13)。そこでタンパク質からの反応性や収率を精査した。この時、検量線用の PTH-アミノ酸 (Fig. 13b) は、 α -アミノ酸混合物の標準液から用時調製した。また、別途 IS 用の $^{13}\text{C}_6$ -PTH-アミノ酸 (Fig. 13c) も同様に用時調製し、タンパク質試料 (Fig. 13a) および検量線試料 (Fig. 13b) に一定量加えて、安定性の問題を解決した。さらに、付加・環化反応を同条件で行うことにより、反応過程による分解も可能な限り相殺した。ちなみに同位体希釈法は、濃度不明の試料に、対応する同位元素標識体 (ここでは $^{13}\text{C}_6$ -PTH-アミノ酸) を一定量スパイクし、標識体/非標識体の比から成分量を求める方法であり、質量分析における内標準法として最適である。本手順で、ヒト血清アルブミン (HSA) をモデルに切り出し効率を精査した結果 (Table 4)、HSA の N 末端、すなわち PTH-Asp は、エドマン分解の 1 サイクル目で 18.3 pmol 定量された。この値は、市販 HSA を純度 100% と仮定した場合の 36.6% であった。しかし、その他に Ala², His³ も定量されており、HSA の N 末端アミノ酸の欠損⁶⁾、市販 HSA の純度、塩の共存等の問題と考えた。一方、2, 3 サイクル目で 2 残基目の PTH-Ala と 3 残基目の PTH-His が各々 15.3, 9.30 pmol と最高値として定量され、インタクトのタンパク質からも配列情報の取得が可能であった。しかし、2, 3 サイクル目で Asp¹ が 2.81, 2.53 pmol 定量されていることから、最初の付加反応を含む各工程における収率向上が必要と考えた。また、PTH-Asp の 3 サイクルでの合計収率から概算した 1 回目の収率は、77% $[18.3/(18.3+2.81+2.53)]$ と先の HSA 量から求めた値 (36.6%) と大きく異なるため、別途市販 HSA のタンパク量の定量等も必要と考えた。一方、1-3 各サイクルにおける PTH-アミノ酸の合計した定量値は、各々 21.5, 18.8, 15.5

pmol と減少傾向にあったが、各サイクルの相対収率は 80%以上であった。

今回の結果は、各 PTH-アミノ酸の予想定量値との乖離が大きく、分析法のバリデーションを困難とするものであった。しかしながら、Brune ら⁵¹⁾と同様、1 サイクル目からの回収率は低いものの、サイクル間の繰り返し収率は高い傾向にあり、妥当と考えた。66 kDa もの大型タンパク質での定量評価は初めてであり、試料調製時の吸着や ATZ-アミノ酸の抽出におけるロスを減らすことで定量値を改善できると考えた。

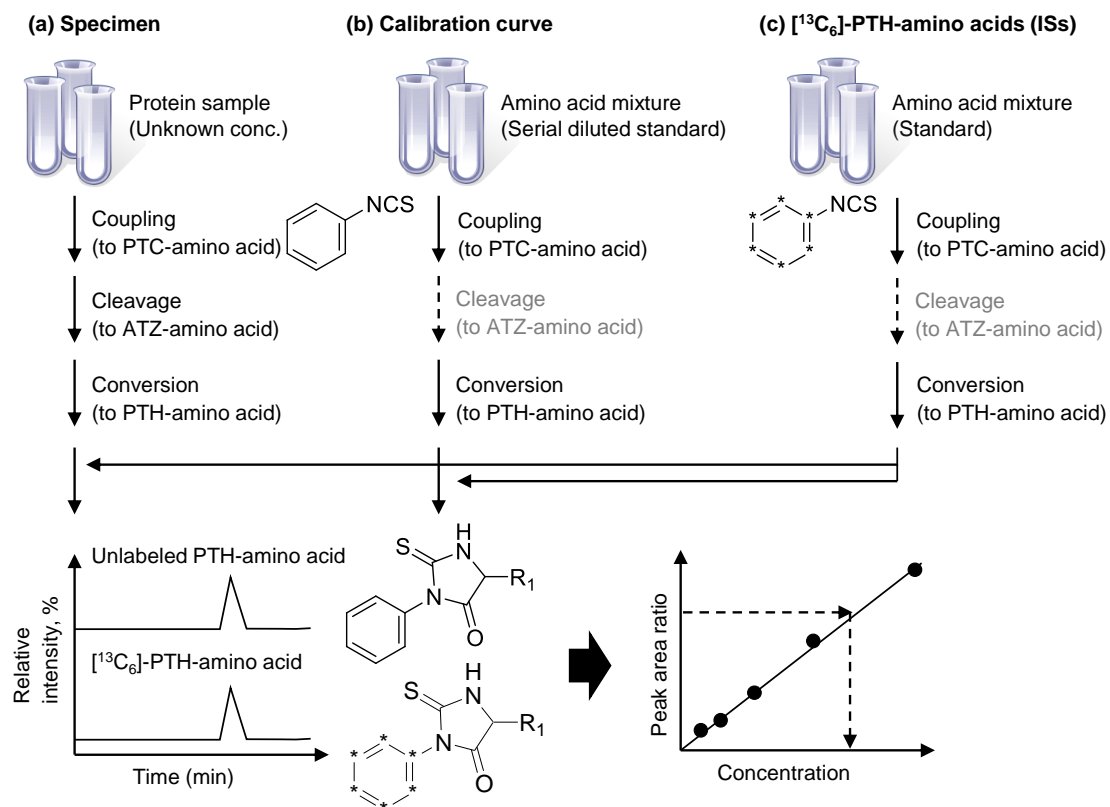


Fig. 13 The entire procedure of the combination of Edman's reagent and mass spectrometry for direct protein analysis: isotope-dilution LC-SRM/MS of PTH-amino acids from N-terminus of peptides or proteins by Edman degradation. Source: R. Satoh, T. Goto, S. H. Lee, T. Oe. *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 8001 (2013).

Table 4 Cleavage of amino acid from serum albumin as PTH-amino acid: a quantitative study.

Amino acid	Repetition of the Edman degradation		
	1	2	3
Asp ¹	18.3	2.81	2.53
Ala ²	0.84	15.3	3.66
His ³	2.39	0.67	9.30

Measured values are expressed as pmol.

第 6 節 結語

本章では，エドマン分解反応物による同位体希釈 LC-SRM/MS を多成分一斉定量に好適な三連四重極型質量分析計にて構築した．標準溶液保存中の分解は $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC と α -アミノ酸検量線との同時調製で解決すると共に，PITC とタンパク質試料とも同時反応させることで分解率の差を相殺した． $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC は，市販の $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリンから one-pot 反応で量論的に得た．また，これを用い，標識 PTH-アミノ酸を α -アミノ酸混合液への 2 段階反応で調製するものとした．LC-SRM/MS 構築では，まず PTH-Leu と PTH-Ile の LC 分離を，逆相系 ODS カラムを用い，ESI に適したギ酸/水/アセトニトリル系移動相により最適化した．その結果，続く SRM で 20 種すべての PTH-アミノ酸が分別可能になった．市販の PTH-アミノ酸標品を用いて各々の MS/MS (プロダクトイオン) を精査した知見から，高選択的な 40 チャンネル SRM を構築した． α -アミノ酸混合液から PTH-アミノ酸を一気に調製し，検量線を作成したところ， r^2 値 0.989 以上の良好な直線性が得られた．HSA からの切り出し効率は，マニュアルでのエドマン分解にもかかわらず，3 サイクル繰り返して 1 残基目の Asp¹ が 77% の効率で回収された．以上，PTH-アミノ酸の安定性をアミノ酸混液の形で担保し，エドマン分解反応物の同位体希釈 LC-SRM/MS の構築，また大型タンパク質からの切り出しも可能なことを示し，エドマン試薬と MS の組合せでタンパク質の直接的かつ定量的な分析が可能であることが判明した．

第2章 エドマン分解によるタンパク質定性に関する検討

第1節 序

エドマン試薬と MS の組合せにより，N 末端解析やアミノ酸配列解析を通常の分解反応より効率化できる．例えばプロテインラダーシーケンス法では，N 末端キャッピング試薬の添加により意図的に不完全なエドマン分解を繰り返し，N 末端からの切断数を異にする混合物（ペプチドラダー）から配列解析する．これには，イソシアネートをキャッピング試薬に用いる方法⁶²⁾や，Fmoc 修飾と固相法を組合せた方法⁶³⁾等がある．また，b₁ イオンを生成する気相エドマン様反応の利用⁶⁴⁾もある．しかしこれらは，ペプチドを対象にしており，タンパク質を直接分析する方法ではない．また，N 末端解析としてヘモグロビン末端アダクトの解析⁶⁵⁾の報告がある．そこで本章では，エドマン分解によるインタクトのタンパク質の直接的定性分析を目的に，N 末端解析とエドマン分解後の残滓からのタンパク質同定を行った．

第2節 タンパク質の N 末端直接解析法の評価

タンパク質の N 末端は，翻訳後のスプライシングやトランケーション等，多様性をもつ場合がある．また，多くのプロテアーゼの基質特異性は C 末端側により特異的であるため，消化ペプチド C 末端のアミノ酸は予想可能（トリプシンでは Lys あるいは Arg）である反面，N 末端側は予想困難である．近年，神経変性疾患関連タンパク質（タウ）の N 末端側欠損状態が，神経毒性を示す凝集体の形成に影響する⁶⁶⁾との報告もあり，タンパク質定性分析における N 末端の直接解析が重要である．ちなみに，古典的な 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（サンガー試薬）⁶⁷⁾や 5-(ジメチルアミノ)ナフタレン-1-スルホニルクロリド（ダンシル試薬）⁶⁸⁾を用いる方法では，N 末端標識ペプチドを 6 M 塩酸で加水分解するため，Asn と Asp，Gln と Glu の分別が困難である．そこで本節では，第1章で構築した LC-SRM/MS の選択性を利用し，インタクトのタンパク質に直接エドマン分解を適用して N 末端を解析した．モデルタンパク質には，HSA， α -カゼイン（ウシ），リゾチーム（ニワトリ卵白），リボヌクレアーゼ A（ウシ），ペプシン（ブタ），インスリン（ウシ）の 6 種を用い，常法にてエドマン分解に付し，得られた PTH-アミノ酸を前章の LC-SRM/MS で解析した（Fig. 14）．その結果，5.7 kDa（インスリン）から 66 kDa（HSA）にわたるタンパク質から PTH-アミノ酸を切り出し，N 末端アミノ酸を同定できた．また，いずれのタンパク質からも，予想されるアミノ酸（HSA，Asp； α -カゼイン，Arg；リゾチーム，Lys；リボヌクレアーゼ A，Lys；ペプシン，Ile；インスリン，Gly（ α 鎖）および Phe（ β 鎖））が主アミノ酸として同定されたが，リボヌクレアーゼ A やペプシン等では，N 末端の不均一性や不純物の混在も示唆された．とりわけプロテアーゼであるペプシンでは，自己消化物由来と思われる Arg, Tyr, Leu 等のアミノ酸が同定された．

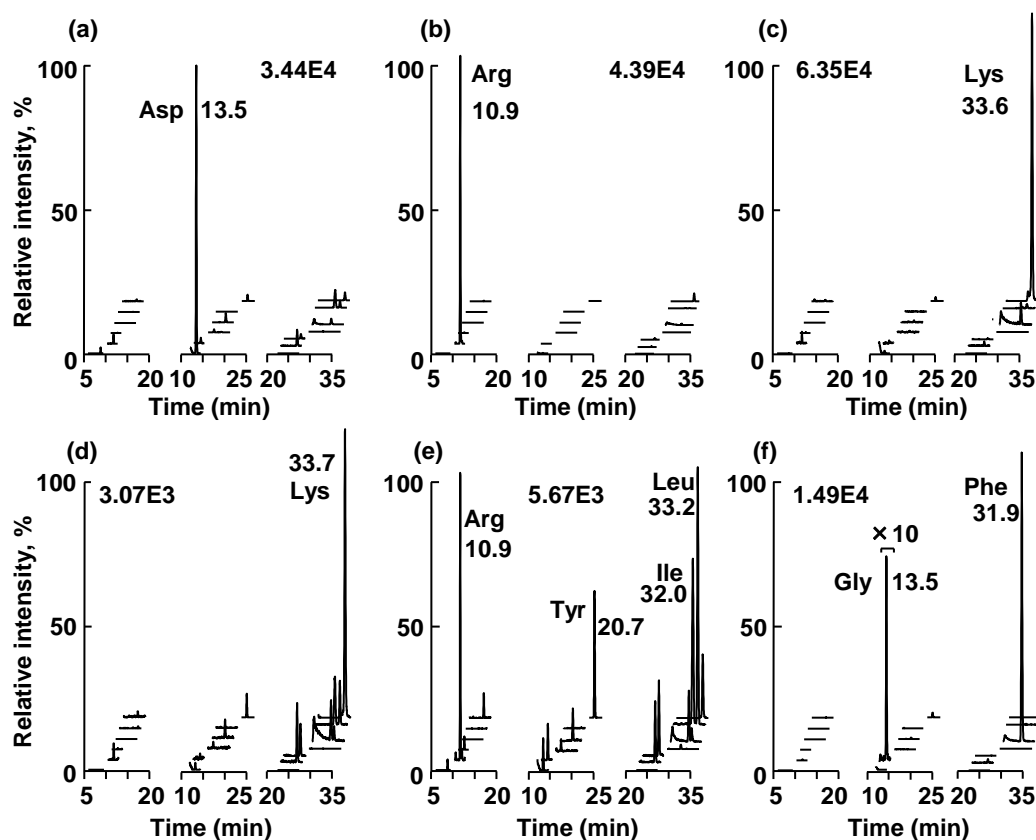


Fig. 14 N-terminal amino acid analyses of six model proteins. Samples: (a) serum albumin (human), (b) α -casein (bovine), (c) lysozyme (chicken), (d) ribonuclease A (bovine), (e) pepsin (porcine), and (f) insulin (bovine).

第3節 エドマン分解試料からのタンパク質の同定

MS によるタンパク質の同定は、トリプシン消化後のパターン分析 (PMF 法), あるいは MS/MS によるシーケンス法により行う. 前章でインタクトのタンパク質からも N 末端アミノ酸を PTH-アミノ酸として切り出せることが判明した. それ故, PTH-アミノ酸によるタンパク質の絶対定量と同定を同時に行うシステム開発を究極の目的と考える際, エドマン分解条件, とりわけ有機系溶媒や強酸を伴う加熱で凝集した残滓からのタンパク質同定の可否が鍵となる. そこで, 凝集タンパク質の再変性を含むトリプシン消化条件を最適化し, ウシ血清アルブミン (BSA) をモデルに, des-1-BSA からの PMF 法による同定を行った. エドマン分解で凝集したタンパク質の変性には, トリスヒドロキシメチルアミノメタン, グアニジン, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む還元アルキル化緩衝液の下, ジチオスレイトール (DTT), ヨードアセトアミド (IAA) を用い常法で還元アルキル化した. 高濃度の塩を含む緩衝液をディスポーザブル透析カセットで脱塩し, トリプシン消化後, 固相抽出カートリッジでペプチド精製し, MALDI/TOF-MS に付した. その結果 (Fig. 15), エドマン分解後の des-1-タンパ

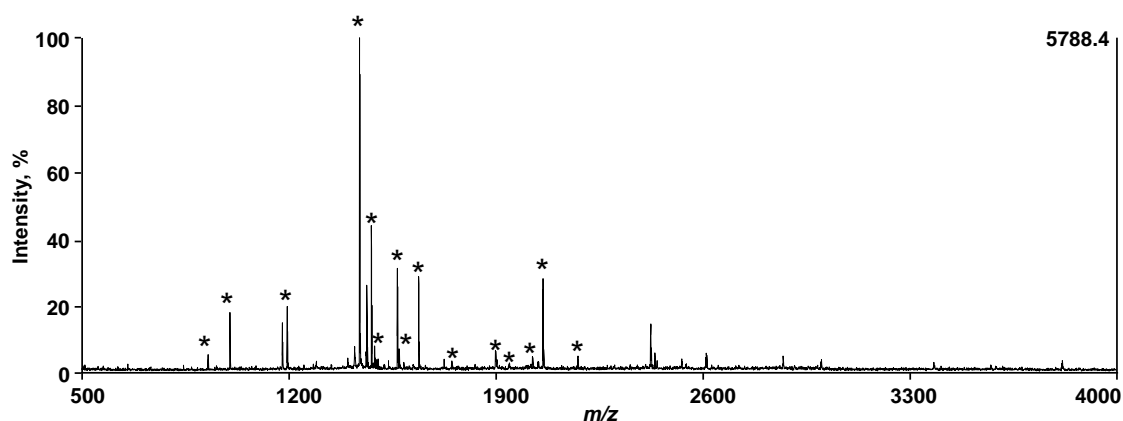


Fig. 15 MALDI/TOF-MS spectrum of des-1-BSA after tryptic digestion. Asterisks indicate the peaks identified as BSA.

ク質消化物でも MS スペクトルの取得ができ, データベース検索の結果, 配列カバー率 23.3% (アミノ酸 583 残基中) で同定された (Table 5). 検出ペプチドに

は、ミス切断 2, 3 のものが含まれ、エドマン分解条件下での変性・凝集が原因だと考えた。

Table. 5 Tryptic peptides of des-1-BSA after Edman degradation identified as BSA using MS-Fit in ProteinProspector.

Sequence	[M+H] ⁺ calculated	[M+H] ⁺ found
Y ¹⁶¹ LYEIAR ¹⁶⁷	927.4934	927.7759
A ²³³ LKAWSVAR ²⁴¹	1001.5891	1001.8312
C* ²²³ ASIQKFGER ²³²	1195.5888	1195.7348
R ³⁶⁰ HPEYAVSVLLR ³⁷¹	1439.8118	1439.8229
L ⁴²¹ GEYGFQNALIVR ⁴³³	1479.7954	1479.7844
F ²²⁹ GERALKAWSVAR ²⁴¹	1490.8227	1490.8136
D ³⁴⁷ AFLGSFLYEYSR ³⁵⁹	1567.7427	1567.6829
K ¹⁵⁶ FWGKLYEIAR ¹⁶⁷	1573.8526	1573.7992
K ⁴³⁷ VPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	1639.9377	1639.8334
L ²⁴² SQKFPKAEFVEVTK ²⁵⁶	1750.9738	1750.7957
L ⁴²¹ GEYGFQNALIVRYTR ⁴³⁶	1900.0076	1899.7353
S ⁸⁹ LHTLFGDELC*KVASLR ¹⁰⁵	1946.0164	1945.7269
K ⁴³⁷ VPQVSTPTLVEVSRSLGK ⁴⁵⁵	2025.1703	2024.8550
Y ⁴³⁴ TRKVPQVSTPTLVEVSR ⁴⁵¹	2060.1499	2059.7789
C* ²²³ ASIQKFGERALKAWSVAR ²⁴¹	2178.1601	2177.7139

C* represents S-carbamidomethyl Cys due to reduction/alkylation step.

第4節 結語

本章では、6種のタンパク質へのエドマン分解により、N末端由来 PTH-アミノ酸の LC-SRM/MS から N 末端アミノ酸解析し、続いて BSA をモデルタンパク質としたエドマン分解残滓の還元アルキル化・トリプシン消化・MALDI/TOF-MS からエドマン分解後タンパク質 (des-1-BSA) の同定をした。N 末端解析の結果から判るように、市販のタンパク質標品のなかには、定量や実験に用いるのに不十分な純度のものが多い。前章の同位体希釈分析法と組合せることで、タンパク質の純度解析への応用が期待される。また、エドマン分解条件で凝集した des-1-タンパク質からも PMF 法によるタンパク質の同定が可能であった。

結 論

本研究では、エドマン分解と MS 各々の問題点を相互に補完し、インタクトのタンパク質に直接適用可能な、定量・定性分析法構築のための基礎的検討を行い、以下の結論を得た。

第 1 章では、 $[^{13}\text{C}_6]$ -PITC を併用し、安定な α -アミノ酸を標準溶液とすることで、安定性・反応収率の誤差を極力抑えた同位体希釈 LC-SRM/MS による PTH-アミノ酸の絶対定量法を構築した。また 66 kDa のタンパク質からでも、80%程度の相対回収率で直接 N 末端アミノ酸の切り出しが可能であることを示し、さらなる最適化や気相法等、既存の技術を使うことで改善が見込まれた。これにより、秤量可能量の標品の確保や純度等の、従来のタンパク質絶対定量の問題点を、PTH-アミノ酸として絶対定量することで解決可能と考える。

第 2 章では、エドマン分解がインタクトのタンパク質に応用可能なことを示し、サンガー試薬の欠点（酸分解による Asn/Asp, Gln/Glu の分別）を改善し得ることを示した。さらにエドマン分解後の凝集試料からもタンパク質の同定が可能なことを示した。

今回得られた知見は、タンパク質の定量・定性を one-injection で行うシステム (Fig. 16) 開発の可能性を示すものである。すなわち、固相エドマン分解装置とトリプシン固定化消化カラムを配した LC-MS システムによる N 末端 PTH-アミノ酸の絶対定量 (SRM) とトリプシン消化ペプチドからのタンパク同定 (MS/MS 法) を行うものである。本法には、濃度不明・未知のタンパク質を、同定と同時に、標品なしで絶対定量できるという有用性がある。それ故、クリアすべき問題点もあるが、バイオマーカー探索・バイオ医薬品開発に資するものと期待できる。

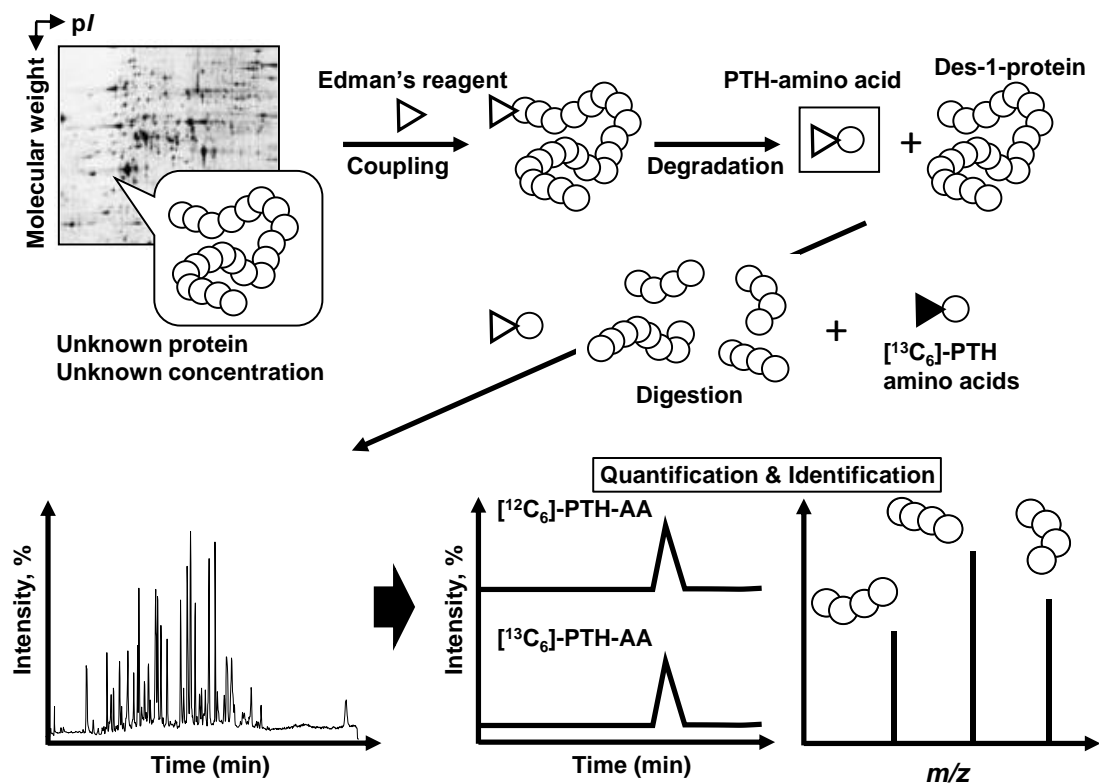


Fig. 16 Future prospects of the concept of quantitative and qualitative protein analysis. The absolute quantitation together with identification of unknown protein (unknown concentration) can be developed using LC-SRM/MS system.

謝 辞

本研究を行うにあたり，終始ご懇篤なご指導・ご鞭撻，そして研究者としての礎を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 大江知行先生に甚大なる感謝を申し上げます．本論文の審査にあたり，有益なるご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 富岡佳久先生，同教授 中林孝和先生に厚く御礼申し上げます．また，研究生活上，格別のご高配を賜りました同講師（現国立研究開発法人日本医療研究開発機構）後藤貴章先生，同助教 李宣和先生に感謝申し上げます．さらに，本研究の遂行にご支援を賜りました臨床分析化学分野の同窓諸氏に深謝致します．FAB-MS および核磁気共鳴（NMR）測定にご協力下さった本研究科中央機器室の皆様にご御礼申し上げます．赤外分光法（IR）および装置のご指導・ご貸与を賜りました本研究科合成制御化学分野の皆様にご感謝致します．MALDI/TOF-MS での分析に際し，ご協力を賜りました東北大学医学系研究科共通機器管理室の皆様にご厚く御礼申し上げます．

本研究の一部は，日本学術振興会科研費（特別研究員奨励費，研究課題番号：14J06347）および旭硝子財団（自然科学系研究奨励費，平成 22–23 年，代表大江知行）の助成を受けたものです．

最後に，私を健やかに育て，理解し，見守って下さった家族，父 宣知，母 薫に，限らない敬意と感謝を表します．

実験の部

試薬および器具

アセトニトリル, アセトン, 安息香酸, エチルメルカプタン, EDTA 二ナトリウム, n-ヘキサン, ギ酸, ギ酸アンモニウム, 酢酸エチル, クロロホルム, DTT, 重クロロホルム (0.03%トリメチルシラン含有), 重炭酸アンモニウム, トリエチルアミン, トリエチルアミン塩酸塩, TFA, 1-ナフタレン酢酸, メタノール, リン酸水素二ナトリウム十二水和物, リン酸二水素ナトリウム二水和物, 標準緩衝液 (pH 4.01, 6.86, 9.18), 0.1 M 塩酸は, ナカライテスク (京都) から購入した. エタノール, DPT, IAA, PTH-Ala, PTH-Arg (塩酸塩), PTH-Asn, PTH-Gln, PTH-Glu, PTH-Gly, PTH-Ile, PTH-Leu, PTH-Met, PTH-Phe, PTH-Pro, PTH-Thr, PTH-Trp, PTH-Tyr, PTH-Val は, 東京化成工業 (東京) から購入した. アミノ酸混合標準液 H 型, シリカゲル (Wakogel[®] FC-40, 20–40 μm , フラッシュカラムクロマトグラフ用), フェノール, L-Gln, L-Trp, L-Asp 一水和物, PITC, PTH-アミノ酸混合標準品, PTH-Asp, PTH-Cys (S-カルボキシメチル化体), PTH-His (塩酸塩), PTH-Lys (N^ε-フェニルチオカルバモイル化体), PTH-Ser, S-カルボキシメチル-L-Cys, トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩は, 和光純薬工業 (大阪) から購入した. ちなみに, アミノ酸混合標準液 H 型は, 0.1 M 塩酸に L-Asn, L-Cys, L-Gln, L-Trp を除く 16 種の標準アミノ酸と L-シスチン, 塩化アンモニウムを各 2.5 mM ずつ含むもの, また, PTH-アミノ酸混合標準品は, PTH-Cys を除く 19 種の PTH-アミノ酸を 20 nmol ずつ含むものである. α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA), α -カゼイン (ウシ, 23 kDa), BSA (66 kDa), インスリン (ウシ, 5.8 kDa), 酸化型インスリン β 鎖 (ウシ, 3.5 kDa), HSA (66 kDa), 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH (18–39), ヒト, 2.5 kDa), ペプシン (ブタ, 35 kDa), リゾチーム (ニワトリ卵白, 14 kDa), リボヌクレアーゼ A (ウシ, 14 kDa) は, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. アンジオテンシン (Ang) I は, American Peptide Company (Sunnyvale, CA, USA) から購入した. Ang II は,

Calbiochem/EMD Chemicals (San Diego, CA) から購入した。トリプシン (ブタ) とグアニジン塩酸塩は, Promega (Madison, WI, USA) から購入した。窒素は, エアーテック (神奈川) 製 AT-50 より得, ESI プローブのシースガスおよび補助ガスとして用いた。MS/MS に用いるアルゴンは, エネックスジャパン (宮城) から購入した。 $[^{13}\text{C}_6]$ -アニリン (99.5 atom% ^{13}C) は, 大陽日酸 (東京) から購入した。ちなみに, アセトニトリル, ギ酸は HPLC グレードを, 各 PTH-アミノ酸は標準品グレードを, PITC, アミノ酸混合標準液 H 型, PTH-アミノ酸混合標準品, 酢酸エチルはアミノ酸配列分析用を用いた。また, アミノ酸混合標準液 H 型は, 0.1 M 塩酸を溶媒とし, L-Gln, L-Asn, L-Trp, L-Cys を除く 16 種の標準アミノ酸, および L-シスチン, 塩化アンモニウムを各 2.5 mM ずつ含む。エタノール, n-ヘキサン, トリエチルアミンは, 蒸留して用いた。水はすべて超純水を用いた。

ポリプロピレン製チューブ (0.6 mL) は, ビーエム機器 (東京) から購入した。固相抽出には, Waters (Milford, MA, USA) 製 Oasis[®] HLB (1 cc, 10 mg) を用いた。透析には, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) 製ディスポーザブル透析カセット Slide-A-Lyzer[®] (3,500 molecular weight cut-off) を用いた。マイクロシリレンジ (5 μL 用) は伊藤製作所 (静岡) 製のもの, また 25 μL および 500 μL 用には, Hamilton (Reno, NV, USA) 製のものを用いた。BSA のエドマン分解時, 反応容器には, ガラス製マイクロ試験管 (50 \times 8 mm o.d.) を用いた。試料の加熱には, ヤマト科学 (東京) 製 HF-21 ブロックヒーターを用いた。酵素消化には, 東京理化器械 (東京) 製 SB-9 振盪槽を同社製 NTT-1110 ヒーターユニットと共に用いた。遠心減圧濃縮には, 東京理化器械製 UT-1000 コールドトラップおよびアルバック (神奈川) 製 GLD-051 ロータリーポンプを備えた東京理化器械製 CVE-3100 を用いた。試料の攪拌には, 大洋化学工業 (和歌山) 製 S-100 ボルテックスミキサーを適宜用いた。遠心分離には, コクサン (東京) 製 H-1300 を, 特記しない限り 10,000 \times g, 1 分で用いた。pH 測定には, 東亜ディーケーケー (東京) 製 HM-25G pH メーターを, pH 4.01, pH 6.86, pH 9.18 の各標準緩衝液で校正し用いた。超

純水の精製には、0.22 μm メンブレンフィルター (EMD Millipore, Billerica, MA) を備えた Milli-Q[®] Integral 10 (EMD Millipore) を用いた。

HPLC

LC システム 1

モデル 2001 高圧グラジエントポンプおよび Model 2002 UV-visible 検出器を備えた資生堂 (東京) 製 Nanospace[™] SI-1 システムを用いた。この時、マニュアルインジェクターとしてステンレス製 50 μL サンプルループを備えた Rheodyne (Cotati, CA) 製 7125 六方バルブを用いた。逆相 HPLC には、ジーエルサイエンス (東京) 製 Inertsil[®] ODS-4 (150 \times 2.1 mm i.d., 3 μm , 100 Å) を室温で用いた。データ処理には、ランタイムインスツルメンツ (静岡) 製 Chromato-PRO[™] 2.0.2 および Microsoft (Redmond, WA, USA) 製 Microsoft[®] Excel[®] 2010 ワークシートを用いた。

LC システム 2

SRD-3600 デガッサー, HPG-3400RS 高圧グラジエントポンプ, WPS-3000TRS オートサンプラー, TCC-3000SD カラムオーブンを備えた Dionex (Sunnyvale) 製 UltiMate[™] 3000 システムに Inertsil[®] ODS-4, Model 2002 UV-visible 検出器を連結し用いた。

LC システム 3

UltiMate[™] 3000 システムに Inertsil[®] ODS-4 を連結し用いた。

質量分析

MS システム 1

日本電子 (東京) 製 JMS-700 二重収束扇形磁場型質量分析計を用いた。

MS システム 2

ESI イオン源を備えた Thermo Fisher Scientific 製 TSQ™ Vantage 三連四重極型質量分析計を用いた。その質量較正には、同社製 Pierce® triple quadrupole calibration solution (Tyr₁, 4 µg/mL; Tyr₃, 12 µg/mL; Tyr₆, 24 µg/mL) を用い、各々のモノアイソトピックピーク ($[M+H]^+$ at m/z 182.082, 508.208, 997.398) に合わせた。真空排気のため Edwards (Crawley, England) 製 E2M30 ロータリーポンプを接続し、補助ポンプとした。

MS システム 3

Applied Biosystems (Framingham, MA) 製 Voyager-DE™ STR 飛行時間型質量分析計を用いた。その質量較正には、飽和 CHCA 溶液 (溶媒: TFA/水/アセトニトリル=0.1:50:50, v/v/v) に溶解した外部標準 (Ang II, 1 pmol; Ang I, 1 pmol; ACTH (18–39), 1 pmol; 酸化型インスリンβ鎖, 10 pmol) を用い、各々のモノアイソトピックピーク ($[M+H]^+$ at m/z 1046.5418, 1296.6853, 2465.1989, 3494.6513) に合わせた。

¹H-NMR

Wilma Glass (Buena, NJ, USA) 製 3 mm 間接検出グラジエントプローブを備えた日本電子製 ECP-500 核磁気共鳴装置を用いた。 [¹³C₆]-PITC (1 mg) を重クロロホルム (0.03% トリメチルシラン含有) 150 µL に溶解し、25 °C, 500 MHz で測定した。化学シフト値δ (ppm) は、トリメチルシランのピークを基準に帰属した。

IR

日本分光 (東京) 製 FTIR-400 フーリエ変換赤外分光光度計を用いた。 [¹³C₆]-PITC を少量のクロロホルムに溶解し、1 滴を KBr 板上で乾かした後に室温で測定した。

溶液類の調製

緩衝液 1 (pH 3)

ギ酸およびギ酸アンモニウムを各々 10 mM 水溶液として調製した。室温下，両者を混合し，pH メーターで pH 3 に合わせた。使用時に緩衝液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 (緩衝液 1) とした。

緩衝液 2 (pH 7)

リン酸二水素ナトリウム二水和物およびリン酸水素二ナトリウム十二水和物を各々 5 mM 水溶液として調製した。室温下，両者を混合し，pH メーターで pH 7 に合わせた。使用時に緩衝液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 (緩衝液 2) とした。

緩衝液 3 (pH 11)

トリエチルアミンおよびトリエチルアミン塩酸塩を各々 5 mM 水溶液として調製した。室温下，両者を混合し，pH メーターで pH 11 に合わせた。使用時に緩衝液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 (緩衝液 3) とした。

HPLC 移動相

0.1% (v/v) ギ酸水溶液とアセトニトリルを 95:5 (v/v)，5:95 (v/v) で混和し，各々 A 相，B 相とした。

還元アルキル化緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩，グアニジン塩酸塩，EDTA 二ナトリウムを水に溶解し，各々最終濃度 1.65, 7.3, 0.03 M となるよう混合した (pH 8.3)。

グラジエント溶出

グラジエント 1

流量 0.2 mL/min で初期 B 相比率 5% とし, はじめの 1 分は移動相 (B) を 5% に保ち, その後 14 分間で 35% まで変化させ, さらに 5 分間維持させるリニアグラジエントを設定した. 洗浄では, その後 5 分間で 95% まで直線的に変化させた. 続く平衡化では 5 分間で 5% まで直線的に変化させた後, 20 分間維持した.

グラジエント 2

流量 0.2 mL/min で初期 B 相比率 5% とし, はじめの 1 分間で移動相 (B) を 5% から 20% に直線的に変化させた後, 14 分間で 35% まで直線的に変化させた. その後, 5 分間で 45% まで上げ, 45% で 15 分間維持するリニアグラジエントを設定した. 洗浄では 1 分間で 95% まで変化させ, 95% で 4 分間維持した. 続く平衡化では 1 分間で 5% まで直線的に変化させた後, 19 分間維持した.

グラジエント 3

流量 0.2 mL/min で初期 B 相比率 5% とし, はじめの 2 分間で移動相 (B) を 5% から 15% まで直線的に変化させた後, 13 分間で 30% まで変化させ, その後の 25 分間で 50% まで変化させるリニアグラジエントを設定した. 洗浄では, さらに 5 分間で 95% まで直線的に変化させた後, 95% で 10 分間維持した. 続く平衡化では, 5 分間で 5% まで直線的に変化させた後, 5% で 20 分間維持した.

ESI 条件

イオン化, ポジティブ; スプレー電圧, +5 kV; キャピラリー温度, 300 °C; シースガス (N₂), 60 (任意単位); 補助ガス (N₂), 55 (任意単位).

第 1 章 付属実験

第 1 章第 2 節

PTH-アミノ酸溶液の調製と保存

各 PTH-アミノ酸標品を次の 4 パートに分けて調製した。すなわち，(i) PTH-Arg, PTH-Glu, PTH-Met, PTH-Phe, PTH-Thr; (ii) PTH-Asn, PTH-Cys, PTH-Gly, PTH-Lys, PTH-Pro; (iii) PTH-Gln, PTH-His, PTH-Leu, PTH-Trp, PTH-Val; (iv) PTH-Ala, PTH-Ile, PTH-Ser, PTH-Tyr とした。各々 25% (v/v) TFA 水溶液，緩衝液 1-3 に溶解し，各 PTH-アミノ酸 100 μ M を含むものとした。IS として，緩衝液 3 (pH 11) には 1-ナフタレン酢酸，(i) および (ii) の 25% (v/v) TFA 水溶液には，安息香酸，それ以外にはフェノールを用い，各々 0.6 mL ポリプロピレン製チューブに乾固した (1-ナフタレン酢酸，50 nmol；安息香酸，500 nmol；フェノール，500 nmol)。各 PTH-アミノ酸 500 μ L を混合し，4 $^{\circ}$ C，暗所で保存した。ちなみに，本節の予備的検討として，PTH-Asp 単独で上記と同様に実験した。すなわち，100 μ M PTH-Asp 溶液となるよう標品を 25% (v/v) TFA 水溶液，緩衝液 1-3 に各々溶解した。あらかじめ 0.6 mL ポリプロピレン製チューブに IS (フェノール 500 pmol) を乾固し，各 100 μ M PTH-Asp 溶液 500 μ L をそれぞれ分注し，十分に攪拌した (終濃度：PTH-Asp, 100 μ M；フェノール，1 mM)。試料を 4 $^{\circ}$ C，暗所で保存した。

PTH-アミノ酸溶液の HPLC-UV

装置には「LC システム I」を用いた。UV 検出波長は，269 nm とした。溶出液には，「HPLC 移動相」を用い，PTH-Asp に対し「グラジエント I」，その他の PTH-アミノ酸に対し「グラジエント 2」を用いた。測定は，25% (v/v) TFA 水溶液，緩衝液 1 (pH 3)，緩衝液 2 (pH 7) 保存条件で，0 (調製直後)，7，14，28 日目に行った。また，pH 11 条件では，0 (調製直後)，1，2，4，8，16 時間

目, および 1, 2, 4 日目に行った. 試料 10 μL をインジェクションした. pH 11 保存条件に限り, 分析直前の試料 10 μL に対し 0.1 M 塩酸を 4 μL 混合し中和後, その全量をインジェクションした. 結果は, ピーク面積に関して PTH-Asp/IS 比を 0 日目の PTH-Asp/IS 比で除し, 残存率 (%) として Microsoft® Excel® 2010 ワークシートを用いてプロットした.

第 1 章第 3 節

[$^{13}\text{C}_6$]-PITC の調製

[$^{13}\text{C}_6$]-PITC は, 既法⁶⁹⁾にて調製した. ちなみに, これは Bures らの報告⁵⁶⁾の変法によった. すなわち, クロロホルム (2 mL) に [$^{13}\text{C}_6$]-アニリン (250 mg, 2.5 mmol) を溶解し, 続けて DPT (1.25 g, 5 mmol) を加えた. 室温で 3 時間攪拌後, さらに 50 °C で 1 時間反応させた. 溶媒留去後, フラッシュシリカゲル (Wakogel® FC-40) 15 g を用いたカラムクロマトグラフィー (展開溶媒, n-ヘキサン) に付し, 無色油状物質を得た (392 mg: 収率 110%). 高分解能 FAB-MS, calculated for $^{13}\text{C}_6^{12}\text{CH}_5\text{NS}$, m/z 141.0344, found, m/z 141.0324 ($\text{M}^{+\cdot}$). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 7.05–7.25 and 7.35–7.55 (doublet of multiplets, $J(^{13}\text{C}-\text{H}) = 167$ Hz, H_{Ar} , 5H). IR (KBr, cm^{-1}): 2078 (-NCS).

第 1 章第 4 節

PTH-Leu と PTH-Ile の LC 分離

装置には「LC システム 2», 溶離液には「HPLC 移動相», 溶出には「グラジェント 3」を用いた. PTH-Leu, PTH-Ile の標品をギ酸/水/アセトニトリル (0.1:75:25, v/v/v) 溶液に溶解し, 各々 10 μM とした. このうち, 10 μL (100 pmol) を HPLC-UV に付した. カラム温度は 45 °C, 検出波長は 269 nm とした.

PTH-アミノ酸のMS/MS スペクトル測定

装置には「MS システム2」および HPG-3400RS 高圧グラジエントポンプを用いた。50% (v/v) アセトニトリル水溶液で各 PTH-アミノ酸標品を溶解し、50 ng/μL とした。試料を 500 μL マイクロシリンジに取り質量分析計付属のシリンジポンプから 0.010 mL/min, 「HPLC 移動相」を高圧グラジエントポンプから 0.2 mL/min で各々送液し、T コネクターで合流後、MS に直接導入した。ちなみに、この時の B 相比率は 30% (ギ酸/水/アセトニトリル=0.1:68:22, v/v/v) とした。「ESI 条件」の下、CE を 30 eV, CID ガス (アルゴン) を 1.0 mTorr とし、プロダクトイオンスキャンを行った (測定時間, 1 分)。データ処理は、Thermo Fisher Scientific 製 Xcalibur™ 2.1.0 付属の定性解析ユーティリティ Qual Browser で行った。

20 種α-アミノ酸混合試料の調製

S-カルボキシメチル-L-Cys, L-Gln, L-Asn, L-Trp をそれぞれ 50% (v/v) アセトニトリル水溶液に溶解し、各 2.5 mM とした。これら 4 つのアミノ酸溶液とアミノ酸混合標準液 H 型 (各アミノ酸 2.5 mM) から 5 μL 用マイクロシリンジで 4 μL ずつ 0.6 mL マイクロチューブに分注した。最後に、遠心減圧濃縮装置で乾固し、20 種α-アミノ酸混合試料 (各アミノ酸 10 nmol) とした。調製した試料は 4 °C で暗所保存した。

20 種¹³C₆]-PTH-アミノ酸の調製

先に調製した [¹³C₆]-PITC 1.41 mg をエタノール/水/トリエチルアミン (8:1:1, v/v/v) 溶液 100 μL に混和し、100 mM [¹³C₆]-PITC 溶液 (用時調製) とした。前項の 20 種α-アミノ酸混合試料に、この反応液を 20 μL 加えた。窒素封入後、チューブの蓋を閉め、ボルテックスミキサーで攪拌 (30 秒) 後、遠心分離した。次いで、ブロックヒーターで加熱 (55 °C, 30 分) した。反応後、ただちに遠心分離し、遠心減圧濃縮 (25 °C, 90 分) した。続いて、反応試料中の過剰試薬を

除去した. すなわち, (i) 100 μL の n-ヘキサンの添加, (ii) 振とう攪拌機による穏やかな攪拌 (1 分), (iii) 遠心分離, (iv) 上清の廃棄を行った. その後, 遠心減圧濃縮 (25 $^{\circ}\text{C}$, 30 分) した. 最後に, 25% (v/v) TFA 水溶液を 50 μL 加え, 窒素封入後, チューブの蓋を閉め, ボルテックスミキサーで攪拌 (30 秒) 後, 遠心分離した. 次に, ブロックヒーターで加熱 (70 $^{\circ}\text{C}$, 30 分) した. 加熱後, たちまちに遠心分離し, 遠心減圧濃縮 (25 $^{\circ}\text{C}$, 120 分) した. 試料は, 使用直前に 25% (v/v) アセトニトリル水溶液 100 μL で再溶解した.

PTH-アミノ酸希釈系列の調製

20 種 α -アミノ酸混合試料 (10 nmol) を 25% (v/v) アセトニトリル水溶液で再溶解し, 各アミノ酸 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 μM の希釈系列を作成した. 各 100 μL をそれぞれ 0.6 mL マイクロチューブ内に分注した後, 遠心減圧濃縮 (25 $^{\circ}\text{C}$, 120 分) し乾固させ, 1 チューブ当たりの各アミノ酸 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10 pmol の試料とした. エドマン分解は, 「20 種 $^{13}\text{C}_6$]-PTH-アミノ酸の調製」に準じ, PITC を用いて行われた. ただし, 25% (v/v) TFA 水溶液での転換反応 (70 $^{\circ}\text{C}$, 30 分) の終了直後に, 先に調製した 20 種 $^{13}\text{C}_6$]-PTH-アミノ酸混合液 2 μL をそれぞれの希釈系列に加え, 遠心減圧濃縮器で溶媒留去 (25 $^{\circ}\text{C}$, 2 時間) した.

検量線の作成

装置には「LC システム 3」を「MS システム 2」に直結したものを, 「ESI 条件」および Table 2 の SRM 条件の下で用いた. なお, SRM を以下の 7 つのセグメントに分けて行った: スキャン幅 (m/z), 1.000; t_{R} 6–9 分 (スキャンタイム 0.2 秒), PTH-His; t_{R} 9.5–12 分 (スキャンタイム 0.1 秒), PTH-Arg, Asn, Gln, Ser, and Thr; t_{R} 12–14.5 分 (スキャンタイム 0.1 秒), PTH-Asp, Gln, Gly, Ser, and Thr; t_{R} 14.5–19.5 分 (スキャンタイム 0.16 秒), PTH-Ala, Cys and Glu; t_{R} 19.5–22.5 分 (スキャンタイム 0.2 秒), PTH-Tyr; t_{R} 22.5–27.5 分 (スキャンタイム 0.16 秒),

PTH-Met, Pro and Val; t_R 27.5–35 分 (スキャンタイム 0.125 秒), PTH-Ile/Leu, Lys, Phe and Trp. なお, スキャンタイムは通常 0.2 秒に設定し, 1 セグメント中の SRM 設定数が 6 以上の場合, 十分なデータポイントを確保するため, その合計が 1 秒以内に収まるようにした. PTH-アミノ酸希釈系列は, 各々 0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 100 μ L に再溶解し, そのうち 10 μ L を LC-SRM/MS に付した. 検量線は, Xcalibur™ 2.1.0 付属の定量解析ユーティリティ Quan Browser で作成した (重み付けなし, 原点無視).

第 1 章第 5 節

本節の実験は, 前節「20 種¹³C₆]-PTH-アミノ酸の調製」, 「PTH-アミノ酸希釈系列の調製」, 「検量線の作成」と同時にを行った.

HSA 試料の調製

HSA を水に溶解して 1 mg/mL 水溶液 (約 15 μ M) とし, さらに水で希釈して 5 μ M のストック溶液とした. このうち, 100 μ L (500 pmol) をマイクロ試験管に分注し, 窒素気流下 (室温) で乾固した.

HSA の収率精査

エタノール/水/トリエチルアミン/PITC (7:1:1:1, v/v/v/v, 用時調製) 溶液 50 μ L を HSA (500 pmol) に加え, ボルテックスミキサーで攪拌 (30 秒) 後, 加熱 (55 °C, 30 分) した. 反応後, ただちに遠心分離し, 窒素気流下 (室温) で溶媒留去した. 続いて, 過剰試薬を除去した. すなわち, (i) n-ヘキサン/酢酸エチル=15:1 (v/v) 溶液 100 μ L の添加, (ii) 振とう攪拌 (3 分), (iii) 上清廃棄をした. (i)–(iii) の操作をさらに 2 回繰り返した. 最後に残存した n-ヘキサン/酢酸エチル=15:1 (v/v) 溶液を窒素気流下 (室温), 溶媒留去した. 次に, TFA: エチルメルカプタン=100:0.1 (v/v, 用時調製) を 50 μ L 加え, ボルテックスミキ

サーで攪拌 (30 秒) 後, 加熱 (55 °C, 20 分) した. 反応後, ただちに遠心分離し, 窒素気流下 (室温) で溶媒留去した. 続いて, ATZ-アミノ酸の抽出を行った. すなわち, (i) 酢酸エチル 100 μ L の添加, (ii) 振とう攪拌 (3 分), (iii) 上清の収集をした. (i)–(iii) の操作をさらに 2 回繰り返した. 抽出・収集した酢酸エチル溶液を, 窒素気流下 (室温) で溶媒留去した. ちなみに, 抽出操作後の残滓は, さらに 2 回, ここまでと同様の反応に付し, 各々 2, 3 サイクル目のエドマン分解試料とした. 溶媒留去後の各試料に 25% (v/v) TFA 水溶液を 50 μ L 加え, ボルテックスミキサーで攪拌 (30 秒) 後, 加熱 (70 °C, 30 分) した. 反応後, ただちに先に調製した 20 種 $^{13}\text{C}_6$]-PTH-アミノ酸混合液 2 μ L を各試料に加え, 遠心減圧濃縮器で溶媒留去 (25 °C, 120 分) した.

同位体希釈 LC-SRM/MS

前節「検量線の作成」の測定条件に準じて行った. 試料を 0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 100 μ L に再溶解し, そのうちの 10 μ L をインジェクションした. データ処理には Quan Browser を用いた.

第2章 付属実験

第2章第2節

タンパク質試料の調製

HSA, リゾチーム, α -カゼイン, ペプシン, リボヌクレアーゼ A, インスリンを各々水に溶解して 1 mg/mL とし, さらに水で希釈して 5 μ M のストック溶液とした. 各 100 μ L (500 pmol) をそれぞれマイクロ試験管内に移し, 窒素気流下 (室温) で乾固した.

タンパク質の N 末端解析

第1章第5節「HSA の収率精査」に準じて行った. 調製した試料は, 0.1% (v/v) ギ酸水溶液/アセトニトリル (3:1, v/v) 溶液 100 μ L に再溶解し, そのうちの 10 μ L を第1章第5節「同位体希釈 LC-SRM/MS」に準じて測定した. データ処理には, Qual Browser を用いた.

BSA のエドマン分解

BSA を 0.1% (v/v) TFA 水溶液に溶解し, 1 mM とした. このうち, 10 μ L (10 nmol) をマイクロ試験管に分注した. エタノール/水/トリエチルアミン/PITC (7:1:1:1, v/v/v/v, 用時調製) 溶液 20 μ L を加え, ブロックヒーターで加熱 (55 $^{\circ}$ C, 15 分) した. 続いて過剰試薬を除去した. すなわち, (i) n-ヘキサン:酢酸エチル=15:1 (v/v), 200 μ L, 1 回 ; (ii) 酢酸エチル, 200 μ L, 1 回 ; (iii) アセトン, 200 μ L, 3 回で洗浄した. TFA:エチルメルカプタン=100:0.1 (v/v, 用時調製) 20 μ L を加え, ブロックヒーターで加熱 (55 $^{\circ}$ C, 15 分) した. 25% (v/v) TFA 水溶液 20 μ L に再溶解後, ブロックヒーターで加熱 (65 $^{\circ}$ C, 30 分) した. 反応後, ただちに窒素気流下 (室温) で溶媒留去した.

エドマン分解後 BSA の還元アルキル化・酵素消化・脱塩精製

前項のエドマン分解後 BSA (10 nmol 相当) に、還元アルキル化緩衝液を溶媒とした 10 mM DTT (用時調製) 50 μ L を加え、インキュベーション (60 °C, 60 分) した。窒素気流下 (室温) で溶媒留去後、還元アルキル化緩衝液を溶媒とした 55 mM IAA (用時調製) 50 μ L を加え、インキュベーション (室温, 45 分, 暗所) した。ディスポーザブル透析カセット Slide-A-Lyzer[®] を用い、還元アルキル化緩衝液の脱塩を行った (水 1 L, 60 分ごとに置換, 3 回)。脱塩した溶液を新たなマイクロ試験管に移し、窒素気流下 (室温) 溶媒留去後、100 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 40 μ L で再溶解した。1.5 μ M トリプシン (溶媒, 100 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) を 4 μ L (酵素:基質=1:4583, w/w) 加え、インキュベーション (37 °C, 16 時間) した。放冷後、1% (v/v) TFA 水溶液 10 μ L を加え、酵素反応を停止した (\leq pH 3)。試料は固相抽出カートリッジ Oasis[®] HLB (1 cc, 10 mg) で脱塩した (浸潤, メタノール 1 mL ; 平衡化, 75% (v/v) アセトニトリル水溶液 1 mL ; 洗浄, 水 1 mL ; 溶出, 75% (v/v) アセトニトリル水溶液 1 mL)。脱塩後の溶出液を窒素気流下 (室温) で溶媒留去後、TFA/水/アセトニトリル=0.1:50:50 (v/v/v) 20 μ L に再溶解した。

MALDI/TOF-MS と PMF 解析

装置には「MS システム 3」, データ処理には Applied Biosystems 製 Data Explorer[™] 4.0.0.0 を用いた。前項の試料を TFA/水/アセトニトリル=0.1:50:50 (v/v/v) 20 μ L に再溶解し, うち, 0.5 μ L (BSA 250 pmol 相当) を MALDI/TOF-MS 試料とした。マトリクスには, TFA/水/アセトニトリル=0.1:50:50 (v/v/v) を溶媒とした飽和 CHCA 溶液 0.5 μ L を用時調製した。両者をステンレス製 MALDI サンプルプレート上に順にロードし, 室温で乾固した。以下の条件に従い測定した: 加速電圧, +20 kV ; グリッド電圧, 64% ; レーザー強度, 1900 ; TOF

モード, リフレクトロン; 引出し遅延時間, 100 ナノ秒; 測定質量範囲 (m/z), 500–5000; 低質量フィルター, オフ; スペクトル積算, 100 回. タンパク質同定には, ProteinProspector 5.14.1 内の PMF ツール MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>) を以下の検索条件で用いた: データベース, SwissProt.2015.3.5; 酵素, トリプシン; 生物分類, ウシ; 最大ミス切断数, 3; 不変的修飾, カルバミドメチル (Cys); 可変修飾, 酸化 (Met); 最少ペプチド一致数, 4; MOWSE P ファクター, 0.4; ピーク種別, モノアイソトピック; 質量許容差, 0.5 Da.

引用文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931–945 (2004). DOI: 10.1038/nature03001.
- 2) A. Persidis. Proteomics. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 393–394 (1998). DOI: 10.1038/nbt0498-393.
- 3) V. Brower. Proteomics: biology in the post-genomic era. *EMBO Rep.*, **2**, 558–560 (2001). DOI: 10.1093/embo-reports/kve144.
- 4) J. Drews. Drug discovery: a historical perspective. *Science*, **287**, 1960–1964 (2000). DOI: 10.1126/science.287.5460.1960.
- 5) G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, H. R. Hoogenboom. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 433–455 (1994). DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245.
- 6) K. Tsuji, K. Tsutani. Approval of new biopharmaceuticals 1999–2006: Comparison of the US, EU and Japan situations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 496–502 (2008). DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.07.013.
- 7) R. E. Banks, M. J. Dunn, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, W. Blackstock, D. J. Pappin. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*, **356**, 1749–1756 (2000). DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03214-1.
- 8) B. Ewing, P. Green. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human gene. *Nat. Genet.*, **25**, 232–234 (2000). DOI: 10.1038/76115.
- 9) G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912–1934 (2002). DOI: 10.1126/science.1075762.
- 10) A. Shilatifard. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 341–348 (2008). DOI: 10.1016/j.ceb.2008.03.019.
- 11) Z. Roth, G. Yehezkel, I. Khalaila. Identification and quantification of protein glycosylation. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, **2012**, 1–10 (2012). DOI: 10.1155/2012/640923.
- 12) S. H. Lee, K. Miyamoto, T. Goto, T. Oe. Non-invasive proteomic analysis of human skin keratins: screening of methionine oxidation in keratins by mass spectrometry. *J. Proteomics*, **75**, 435–449 (2011). DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.010.
- 13) T. Goto, K. Murata, S.H. Lee, T. Oe. Complete amino acid sequencing and immunoaffinity clean-up can facilitate screening of various chemical modifications on human serum albumin. *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 7383–7395 (2013). DOI: 10.1007/s00216-013-7146-0.

- 14) K. Biemann, C. Cone, B. R. Webster, G. P. Arsenault. Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5598–5606 (1966). DOI: 10.1021/ja00975a045.
- 15) K. Ishikawa, Y. Niwa. Computer-aided peptide sequencing by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**, 373–380 (1986). DOI: 10.1002/bms.1200130709.
- 16) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64–71 (1989). DOI: 10.1126/science.2675315.
- 17) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151–153 (1988). DOI: 10.1002/rcm.1290020802.
- 18) K. R. Jonscher, J. R. Yates III. The quadrupole ion trap mass spectrometer—a small solution to a big challenge. *Anal. Biochem.*, **244**, 1–15 (1997). DOI: 10.1006/abio.1996.9877.
- 19) D. J. C. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Biol.*, **3**, 327–332 (1993). DOI: 10.1016/0960-9822(93)90195-T.
- 20) J. A. Taylor, R. S. Johnson. Sequence database searches *via de Novo* peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1067–1075 (1997). DOI: 10.1385/MB:22:3:301.
- 21) D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551–3567 (1999). DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.
- 22) J. K. Eng, A. L. McCormack, R. Yate, III. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 976–989 (1994). DOI: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.
- 23) K. Biemann. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **16**, 99–111 (1988). DOI: 10.1002/bms.1200160119.
- 24) K. Biemann, H. A. Scoble. Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. *Science*, **237**, 992–998 (1987) DOI: 10.1126/science.3303336.
- 25) S. E. Ong, B. Blagoy, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 376–386 (2002). DOI: 10.1074/mcp.M200025-MCP200.
- 26) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994–999

(1999). DOI: 10.1038/13690.

- 27) P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin. Multiplexed protein quantitation in *saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 1154–1169 (2004). DOI: 10.1074/mcp.M400129-MCP200.
- 28) S. Sechi, Y. Oda. Quantitative proteomics using mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 70–77 (2003). DOI: 10.1016/S1367-5931(02)00010-8.
- 29) T. Oe, B. L. Ackermann, K. Inoue, M. J. Berna, C. O. Garner, V. Gelfanova, R. A. Dean, E. R. Siemers, D. M. Holtzman, M. R. Farlow, I. A. Blair. Quantitative analysis of amyloid β peptide in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients by immunoaffinity purification and stable isotope dilution liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3723–3735 (2006). DOI: 10.1002/rcm.2787.
- 30) J. Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S. Ito, T. Terasaki. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel *in-silico* peptide selection criteria. *Pharm. Res.*, **25**, 1469–1483 (2008). DOI: 10.1007/s11095-008-9532-4.
- 31) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951). PMID: 14907713.
- 32) S. M. Read, D. H. Northcote. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, **116**, 53–64 (1981). DOI: 10.1016/0003-2697(81)90321-3.
- 33) G. A. Bonwick, C. J. Smith. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **39**, 817–827 (2004). DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.00855.x.
- 34) P. Edman. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283–293 (1950). DOI: 10.3891/acta.chem.scand.04-0283.
- 35) P. Edman. On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides, *Acta Chem. Scand.*, **10**, 761–768 (1956). DOI: 10.3891/acta.chem.scand.10-0761.
- 36) R. S. Thoma, J. S. Smith, W. Sandoval, J. W. Leone, P. Hunziker, B. Hampton, K. D. Linse, N. D. Denslow. The ABRF ESRG 2008 study: investigation into homopolymeric amino acid N-terminal sequence tags and their effects on automated Edman degradation. *J. Biomol. Tech.*, **20**, 216–225 (2009). PMID: 19721823.
- 37) D. H. Schlesinger, G. Goldstein, H. D. Niall. The complete amino acid sequence of ubiquitin an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochem.*, **14**,

- 2214–2218 (1975). DOI: 10.1021/bi00681a026.
- 38) P. Edman, G. Begg. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80–91 (1966). DOI: 10.1007/978-3-662-25813-2_14.
 - 39) N. F. Totty, M. D. Waterfield, J. J. Hsuan. Accelerated high-sensitivity microsequencing of proteins and peptides using a miniature reaction cartridge. *Protein Sci.*, **1**, 1215–1224 (1992). DOI: 10.1002/pro.5560010914.
 - 40) H. Maeda, H. Kawauchi. A new method for the determination of N-terminus of peptides chain with fluorescein-isothiocyanate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 188–192 (1968). DOI: 10.1016/0006-291x(68)90728-6.
 - 41) K. Imai, S. Uzu, K. Nakashima, S. Akiyama. Synthesis of novel fluorogenic Edman reagents, 7-*N,N*-dimethylaminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl)isothiocyanate (DBD-NCS) and 7-aminosulphonyl-4-(2,1,3-benzoxadiazolyl)isothiocyanate (ABD-NCS). *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 56–57, (1993). DOI: 10.1002/bmc.1130070114.
 - 42) D. Jin, K. Nagakura, S. Murofushi, T. Miyahara, T. Toyo'oka. Total resolution of 17 DL-amino acids labelled with a fluorescent chiral reagent, R(–)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **882**, 215–224 (1998). DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00617-7.
 - 43) B. Samyn, K. Sergeant, J. V. Beeumen. A method for C-terminal sequence analysis in the proteomic era (proteins cleaved with cyanogen bromide). *Nat. Protoc.*, **1**, 318–323 (2006). DOI: 10.1038/nprot.2006.50.
 - 44) H. Kuyama, K. Shima, K. Sonomura, M. Yamaguchi, E. Ando, O. Nishimura, S. Tsunasawa. A simple and highly successful C-terminal sequence analysis of proteins by mass spectrometry. *Proteomics*, **8**, 1539–1550 (2008). DOI: 10.1002/pmic.200701044.
 - 45) K. Graham, J. E. Shively. Improved initial yields in C-terminal sequence analysis by thiohydantoin chemistry using purified diphenylphosphoryl isothiocyanate: NMR evidence for a reaction intermediate in the coupling reaction. *Anal. Biochem.*, **307**, 202–211 (2002). DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00025-8.
 - 46) J. Li, S. Liang. C-terminal sequence analysis of peptides using triphenylgermyl isothiocyanate. *Anal. Biochem.*, **302**, 108–113 (2002). DOI: 10.1006/abio.2001.5505.
 - 47) J. Leng, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, H. Wang, T. Cai, J. Yao, Y. Guo. Integration of high accuracy N-terminus identification in peptide sequencing and comparative protein analysis via isothiocyanate-based isotope labeling reagent with ESI ion-trap TOF MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22**, 1204–1213 (2011). DOI: 10.1007/s13361-011-0129-5.
 - 48) E. Guillaume, A. Panchaud, M. Affolter, V. Desvergnès, M. Kussmann. Differentially isotope-coded N-terminal protein sulphonation: combining protein identification and quantification. *Proteomics*, **6**, 2338–2349 (2006). DOI: 10.1002/pmic.200500527.

- 49) H. V. J. Kolbe, R. C. Lu, H. Wohlrab. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation and quantitation of phenylthiohydantoin derivatives of 25 amino acids, including those of cysteic acid, 4-hydroxyproline, methionine sulfone, S-carboxymethylcysteine and S-methylcysteine. *J. Chromatogr.*, **327**, 1–7 (1985). DOI: 10.1016/S0021-9673(01)81633-2.
- 50) F. Rusnak, G Hathaway. Application of a coupled reducing system to Edman sequencing. *J. Biomol. Tech.*, **12**, 40–43 (2001). PMID: 19499071.
- 51) D. C. Brune, B. Hampton, R. Kobayashi, J. W. Leone, K. D. Linse, J. Pohl, R. S. Thoma, N. D. Denslow. ABRF ESRG 2006 study: Edman sequencing as a method for polypeptide quantitation. *J. Biomol. Tech.*, **18**, 306–320 (2007). PMID: 18166674.
- 52) O. H. V. Orden, F. H. Carpenter. Hydrolysis of phenylthiohydantoin of amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 399–403 (1964). DOI: 10.1016/0006-291x(64)90075-0.
- 53) J. J. Ares, J. W. Fowble, T. G. Urchek, D. D. Miller. Synthesis and application of ¹³C enriched phenylisothiocyanate as a ¹³C NMR protein probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 1064–1071 (1987). DOI: 10.1016/0006-291X(87)91523-3.
- 54) J. E. Hodgkins, W. P. Reeves. The modified Kaluza synthesis. III. The synthesis of some aromatic isothiocyanates. *J. Org. Chem.*, **29**, 3098–3099 (1964). DOI: 10.1021/jo01033a524.
- 55) S. Kim, K. Y. Yi. Di-2-pyridyl thionocarbonate. A new reagent for the preparation of isothiocyanates and carbodiimides. *Tetrahedron Lett.*, **26**, 1661–1664 (1985). DOI: 10.1016/S0040-4039(00)98578-2.
- 56) E. J. Bures, H. Nika, D. T. Chow, H. D. Morrison, D. Hess, R. Aebersold. Synthesis of the protein-sequencing reagent 4-(3-pyridinylmethylaminocarboxypropyl) phenyl isothiocyanate and characterization of 4-(3-pyridinylmethylaminocarboxypropyl) phenylthiohydantoin. *Anal. Biochem.*, **224**, 364–372 (1995). DOI: 10.1006/abio.1995.1052.
- 57) P. Edman. Preparation of phenyl thiohydantoin from some natural amino acids. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277–282 (1950). DOI: 10.3891/acta.chem.scand.04-0277.
- 58) S. Tsunasawa, J. Kondo, F. Sakiyama. Isocratic separation of PTH-amino acids at picomole level by reverse-phase HPLC in the presence of sodium dodecylsulfate. *J. Biochem.*, **97**, 701–704 (1985). PMID: 4008475.
- 59) H. Aoyama, A. Iwamatsu, G. Dibó, S. Tsunasawa, F. Sakiyama. An improved isocratic HPLC separation of PTH-amino acid at the subpicomole level and its application to protein sequence analysis. *J. Protein Chem.*, **7**, 191 (1988). DOI: 10.1007/BF02116161.
- 60) A. T. Lebedev, E. Damoc, A. A. Makarov, T. Y. Samgina. Discrimination of leucine and isoleucine in peptides sequencing with orbitrap fusion mass spectrometer. *Anal. Chem.*, **86**, 7017–7022 (2014). DOI: 10.1021/ac501200h.

- 61) B. Chan, N. Dodsworth, J. Woodrow, A. Tucker, R. Harris. Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.*, **227**, 524–528 (1995). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20419.x.
- 62) B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. Kent. Protein ladder sequencing. *Science*, **262**, 89–92 (1993) DOI: 10.1126/science.8211132.
- 63) A. Thakkar, A. S. Wavreille, D. Pei. Traceless capping agent for peptide sequencing by partial Edman degradation and mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **78**, 5935–5939 (2006). DOI: 10.1021/ac0607414.
- 64) S. G. Summerfield, M. S. Bolgar, S. J. Gaskell. Promotion and stabilization of b₁ ions in peptide phenylthiocarbamoyl derivatives: analogies with condensed-phase chemistry. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 225–231 (1997). DOI:10.1002/(SICI)1096-9888(199702)32:2<225::AID-JMS471>3.0.CO;2-#.
- 65) H. Carlsson, H. von Stedingk, U. Nilsson, M. Törnqvist. LC–MS/MS screening strategy for unknown adducts to N-terminal valine in hemoglobin applied to smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.*, **27**, 2062–2070 (2014). DOI: 10.1021/tx5002749.
- 66) M. Derisbourg, C. Leghay, G. Chiappetta, F.-J. Fernandez-Gomez, C. Laurent, D. Demeyer, S. Carrier, V. Buée-Scherrer, D. Blum, J. Vinh, N. Sergeant, Y. Verdier, L. Buée, M. Hamdane. Role of the tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci. Rep.*, **5**, 1–10 (2015). DOI: 10.1038/srep09659.
- 67) F. Sanger. The free amino groups of insulin. *Biochem.*, **39**, 507–515 (1945). DOI: 10.4159/harvard.9780674366701.c129.
- 68) J. P. Zanetta, G. Vincendon, P. Mandel, G. Combos. The utilisation of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride for quantitative determination of free amino acids and partial analysis of primary structure of proteins. *J. Chromatogr.*, **51**, 441–458 (1970). DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96893-1.
- 69) T. Oe, M. Maekawa, R. Satoh, S. H. Lee, T. Goto. Combining [¹³C₆]-phenylisothiocyanate and the Edman degradation reaction: a possible breakthrough for absolute quantitative proteomics together with protein identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 173–179 (2010). DOI: 10.1002/rcm.4372.

発表論文リスト

1. Tomoyuki Oe, Masamitsu Maekawa, Ryo Satoh, Seon Hwa Lee, Takaaki Goto:
Combining [$^{13}\text{C}_6$]-phenylisothiocyanate and the Edman degradation reaction: a possible breakthrough for absolute quantitative proteomics together with protein identification.
Rapid Communications in Mass Spectrometry, **24**, 173–179 (2010).
DOI: 10.1002/rcm.4372
2. Ryo Satoh, Takaaki Goto, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe:
Can Edman degradation be used for quantitation? Isotope-dilution liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and the long-term stability of 20 phenylthiohydantoin-amino acids.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, **405**, 8001–8010 (2013).
DOI: 10.1007/s00216-013-6901-6